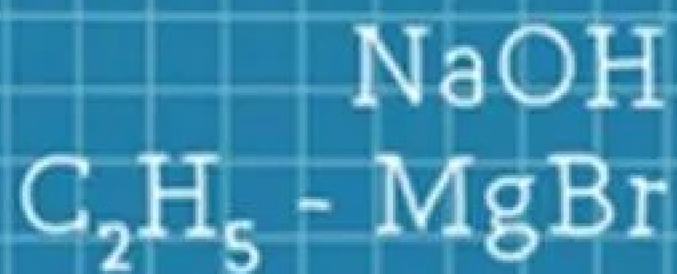
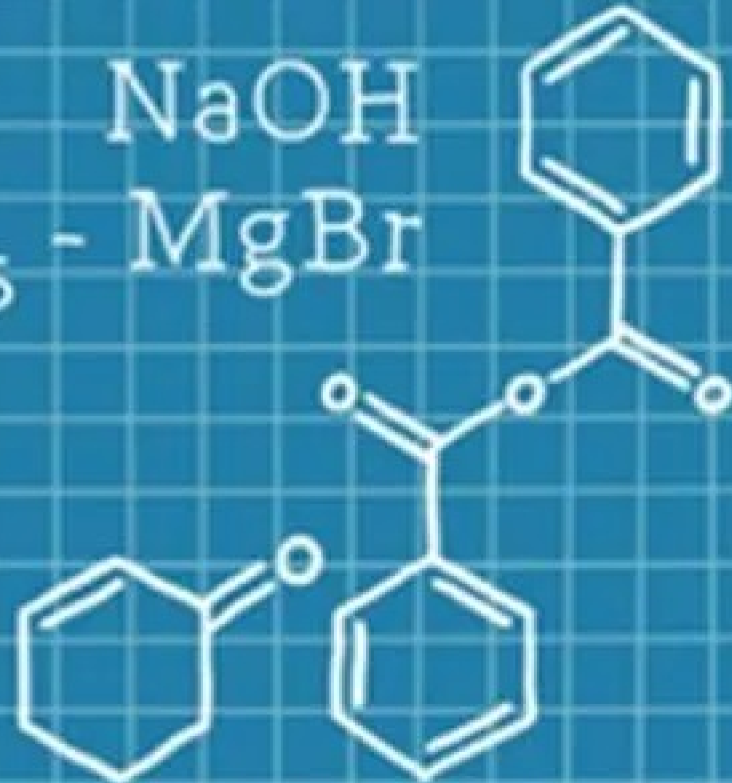
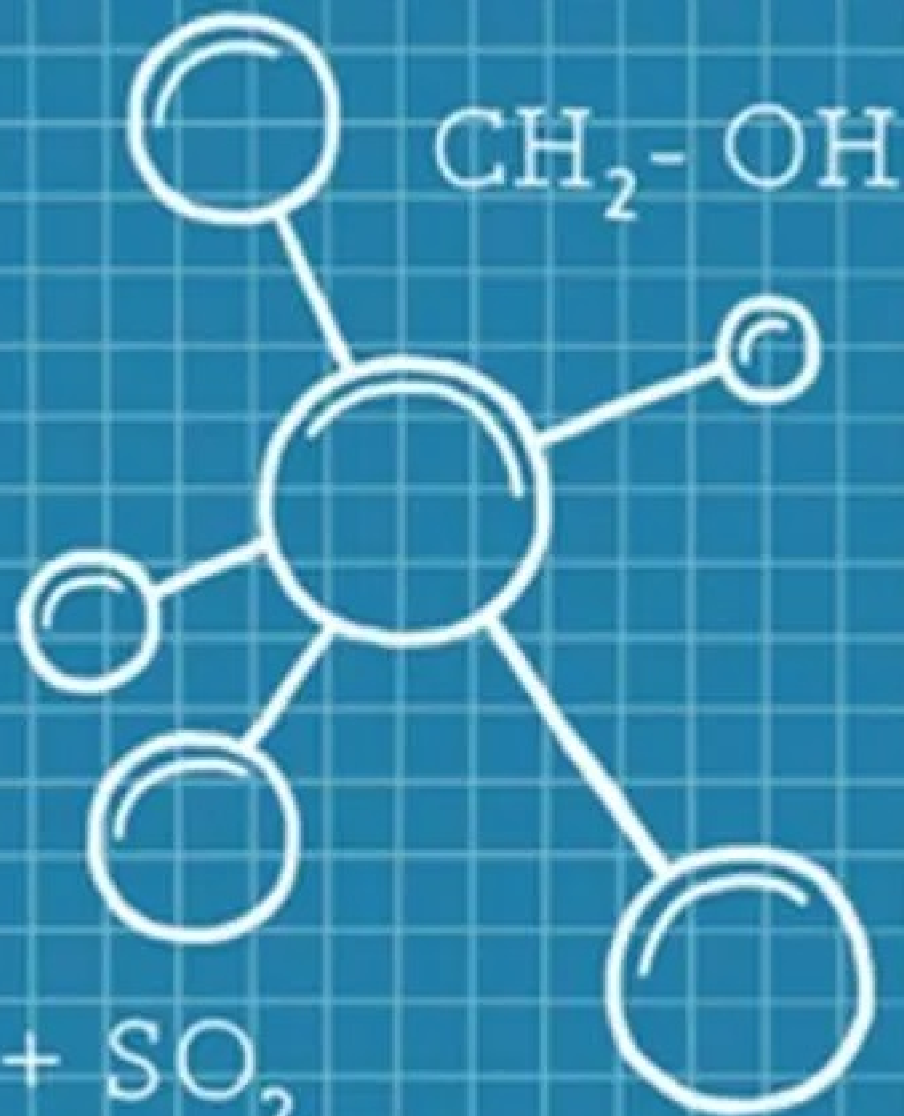
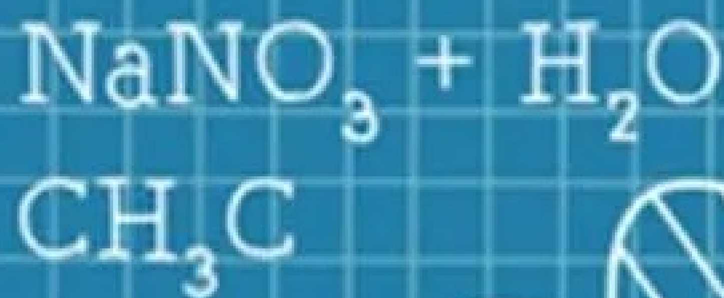


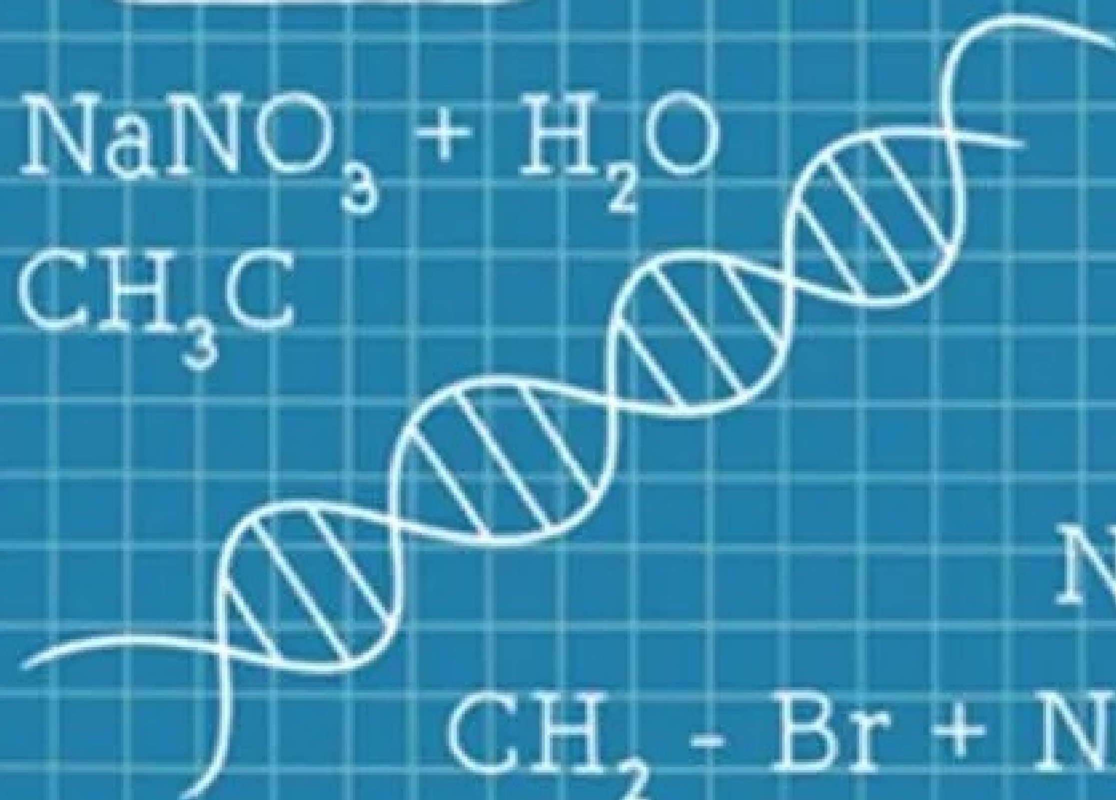

$NaOH$
C_2H_5 - $MgBr$

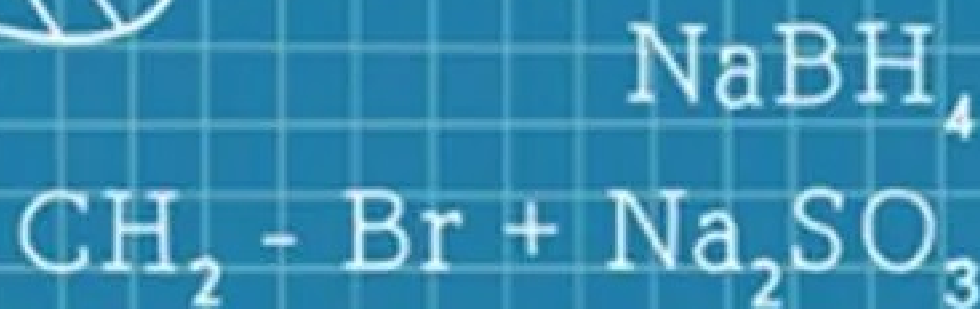



CH_2- OH

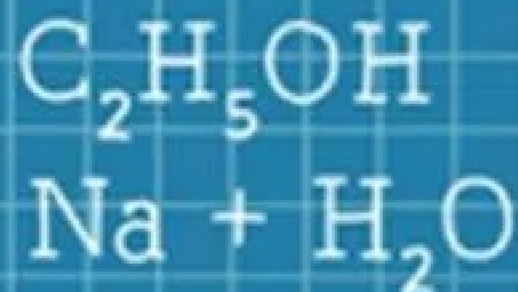

$NaNO_3 + H_2O$
CH_3C


Mg - $Br + SO_2$




$NaBH_4$
CH_2 - $Br + Na_2SO_3$




C_2H_5OH
$Na + H_2O$

CUPRINS

INTRODUCERE

Dezvoltarea actuală a biologiei şi biochimiei depinde într-o măsură însemnată de elaborarea şi utilizarea unor noi metode de investigaţie biochimică. Cu fiecare an creşte numărul diferitelor metode fizice, fizico-chimice şi chimice de analiză care dobîndesc importanţă şi o răspîndire tot mai mare în studiul proceselor biochimice caracteristice organismelor animale, vegetale şi microorganismelor. In acelaşi timp se perfecţionează acele metode care deja de mult timp se folosesc în laboratoarele de biochimie. Obţinerea unor rezultate ştiinţifice remarcabile poate deveni o stare de fapt numai dacă se cunosc principiile teoretice şi metodologia noilor tehnici experimentale tot mai complicate şi dacă specialiştii posedă deprinderile practice necesare exploatării aparaturii reclamate de aceste tehnici.

In legătură cu cele de mai sus, se impunea cerinţa stringentă de a se elabora un nou manual de lucrări practice de biochimie, care să cuprindă cele mai eficiente şi specifice metode întrebuinţate în cercetarea biochimică.

Intrucît manualul de lucrări practice se adresează în primul rînd studenţilor, prezentarea metodelor pe care le conţine nu constituie o simplă descriere, ci ele se expun pe baza experienţei generată de cei peste 20 de ani de activitate didactică şi ştiinţifică a autorilor. Aceştia s-au străduit să acorde atenţia cuvenită dezvoltării la studenţi a capacităţii pentru activitatea individuală. In asemenea scopuri, fiecare metodă din "Practicum de biochimie generală" este concepută după un plan care include aspectele teoretice necesare pentru înţelegerea experimentului, mecanismul reacţiilor chimice studiate, prepararea reactivilor, tehnica de lucru, discuţia rezultatelor obţinute în experienţele efectuate, accentuîndu-se permanent valoarea practică a determinării diferiţilor indicatori biochimici în procesele de producţie, pentru controlul calităţii produselor, precizarea diagnosticului numeroaselor maladii etc.

Prin spectrul problematicii abordate, prezentul îndrumător de lucrări practice este destinat studenţilor din anul al II-lea

de la facultatea de biologie.Insă el poate fi recomandat şi studenţilor biologi din anii mai mari,studenţilor facultăţii de medicină sau facultăţii de agronomie,doctoranzilor,cercetătorilor şi tuturor celor cu preocupări în domeniul biochimiei.

Elaborînd "Practícum de biochimia generală" autorii au fost animaţi de ideea de a oferi un omagiu tovarăşei prof.dr.Elisabeta Văscăuţanu care a organizat şi condus primele lucrări practice de biochimie cu studenţii biologi în universitatea ieşeană.

Tinem şi pe această cale să exprimăm recunoştinţa noastră profundă tovarăşului prof.dr.doc.şt.Leonid Ababei(Institutul de Medicină şi Farmacie,Iaşi),tovarăşei prof.dr.ing.Ionela Popescu (Institutul Agronomic Iaşi) şi tovarăşului conf.dr.Alexandru Nacu(Institutul Politehnic Iaşi) pentru referatul de analiză asupra lucrării şi pentru observaţiile constructive şi sugestiile preţioase făcute cu privire la conţinutul ei.

Pentru toate aprecierile şi propunerile menite să ducă la îmbunătăţirea unei noi ediţii a acestei lucrări,autorii mulţumesc anticipat cititorilor.

SECURITATEA MUNCII IN LABORATORUL DE BIOCHIMIE

In laboratoarele de biochimie, activitatea este în general ferită de accidente, în cazul cînd se lucrează atent şi corect. Accidentele pot surveni din neglijenţa celor care lucrează.Acestea pot fi :

a)intoxicaţii, datorate pătrunderii unor substanţe toxice în organism pe calea aparatului respirator, prin tubul digestiv, sau prin piele.

Intoxicaţiile pot fi acute, atunci cînd toxicul pătrunde într-un timp scurt şi în cantitate ce depăşeşte doza limită, sau cronice, prin acumularea unor doze mici şi repetate în timp.

b)arsuri produse, fie prin contact termic, fie cu substanţe caustice (NaOH, KOH) sau acizi ;

c)traumatisme provocate de explozii (de butelii, de vase sub presiune),tăieturi cu sticlă sau loviri ;

d)electrocutări ce survin la mînuirea defectuoasă a aparatelor avînd o izolare necorespunzătoare sau fără a fi legate la pămînt ;

e)boli transmisibile, datorită înghiţirii sau inhalării produselor infectate sau prin contact ;

f)muşcături de animale de laborator (şobolani, şoareci, etc.) ;

g)iradiere cu izotopi radioactivi.

Tinînd cont de acestea şi de faptul că studenţii din anul II iau pentru prima dată contact cu un laborator de biochimie, am considerat necesară prezentarea unor norme de protecţia muncii după cum urmează :

I.Organizarea şi controlul activităţii de laborator cu studenţii

Conducătorul laboratorului are sarcina de a instrui şi de a examina periodic, întregul personal al laboratorului asupra normelor de tehnica securităţii muncii, de a verifica respectarea instrucţiunilor, de a propune sancţiuni în caz de nerespectare a acestora şi de a supraveghea îndeaproape desfăşurarea activităţilor în locurile periculoase.De asemenea are sarcina de a semnala

deficienţele din punct de vedere al protecţiei muncii ce nu le poate rezolva cu forţe proprii, de a se îngriji de completarea trusei de prim ajutor cu medicamentele şi pansamentele necesare.

Păstrarea ordinii şi disciplinii reprezintă o problemă esenţială a protecţiei muncii.

Inainte de începerea lucrului la o instalaţie de laborator se va elabora de către conducătorul de lucrări instrucţiunile de lucru pentru fiecare loc de muncă în parte.

Se interzice în mod categoric lucrul fără completarea fişei de protecţia muncii semnată şi prelucrată în faţa întregului colectiv.

La terminarea lucrărilor, conducătorul laboratorului este obligat să verifice :

-dacă sînt închise conductele de gaz şi robinetele de apă;

-dacă sînt stinse becurile de gaz, de lumină electrică,precum şi celelalte aparate electrice sau cu foc ;

-dacă sînt închise bine buteliile cu gaze ;

-dacă ventilaţia este în bună stare de funcţionare ;

II.Amenajarea şi dotarea laboratoarelor

A.Condiţii generale

Laboratoarele trebuie să fie situate într-un spaţiu liniştit, prevăzut cu instalaţii utilitare (energie electrică, gaze, apă, canalizare) care să permită desfăşurarea activităţii de laborator în condiţii optime.

Ferestrele trebuie să fie mari, să se poată face ventilaţia la nevoie, în cel mai scurt timp.

Culoarele trebuie să fie suficient de largi pentru a permite deplasarea şi circulaţia cărucioarelor.Se interzice depozitarea materialelor şi executarea operaţiilor pe culoare.

Reţeaua de gaze a laboratorului trebuie să aibă un ventil central, care să permită oprirea gazelor pentru întreg laboratorul.

B.Ventilaţia şi condiţionarea aerului

Pentru a evita recircularea aerului viciat este necesară admisia aerului din exterior.Instalaţia de ventilaţie cu caracter general cu refulare de aer şi de absorbţia aerului viciat din încăperi, va fi separată de instalaţia de ventilaţie pentru nişe.

Este necesar ca în fiecare laborator să se găsească nişe prevăzute cu instalaţie de gaz, apă şi scurgere, cu o bună ventilaţie, fiind menţinute în bună stare de funcţionare.

Toate lucrările în care se folosesc substanţe deosebit de toxice se vor executa numai sub nişe.Nu se admite să se lucreze cu lichide inflamabile sub nişe ce nu au ventilaţia bună.

Nu este admis să se încarce nişa cu vase, aparate şi utilaje de laborator, în afară de cele ce sînt necesare la efectuarea lucrării respective.In nişe se va păstra tot timpul ordinea şi curăţenia.

C.Amenajări interioare

Mesele de laborator vor fi construite din material antiacid şi vor fi prevăzute cu toate anexele necesare (apă,scurgere, gaze,curent electric).Anexele meselor de laborator vor fi dispuse în aşa fel, încît să uşureze cît mai mult munca avînd comenzile în general fixate în faţa lor.

III.Tehnica de lucru

1.Generalităţi

Inainte de începerea lucrărilor se aranjează ţinuta de lucru (halat, mănuşi,ochelari de protecţie etc.) şi se aşează în ordine pe masa de lucru toate materialele de care este nevoie.Nu se recomandă a se pune pe masa de laborator obiecte sau substanţe nefolosite în cadrul lucrărilor de zi.

Lucrările practice de laborator trebuie să fie executate numai cu cantităţile şi concentraţiile de substanţe strict necesare,precis cîntărite sau măsurate, cu respectarea condiţiilor indicate în referatele de specialitate puse la dispoziţia studenţilor.

Inainte de punerea în exploatare a unei instalaţii de laborator sau începerea lucrului la un aparat,studentul trebuie să prezinte cadrului didactic îndrumător de laborator,principiul şi modul de funcţionare a instalaţiei sau aparatului, verificîndu-se astfel corectitudinea conexiunilor efectuate şi cunoaşterea de către student a ordinii operaţiilor ce se vor executa.

Nu este permis ca sticlele cu soluţii şi reactivi să fie lăsate deschise pe mese, sau să se schimbe dopurile de la un vas

în altul. Fiecare sticlă va purta o etichetă pe care va fi trecută corect formula substanţei conţinute. Cînd se toarnă reactivi din sticle, nu trebuie să se prelingă peste etichete, distrugîndu-le şi făcînd în felul acesta greu de citit numele reactivului.

Lucrările vor fi executate numai în vase perfect curate, iar înainte de plecarea din laborator, se spală şi se pun în ordine vasele cu care s-a lucrat, nelăsîndu-se materialul folosit pe mese, şi nepunîndu-l în alt loc decît acela de unde a fost luat. Pot fi lăsate pe mese numai aparatele care urmează să fie folosite în ziua următoare.

Este interzisă gustarea substanţelor şi a soluţiilor cu care se lucrează precum şi mirosirea lor fără precauţie. In cazul substanţelor toxice volatile, vasul se ţine la distanţă, iar vaporii care se degajă se apropie de nări prin mişcarea mîinii.

In timpul desfăşurării lucrărilor nu este permisă aplecarea asupra vasului în care s-a turnat sau fierbe un lichid oarecare, de asemenea nu este permisă înclinarea vasului respectiv spre manipulant.

Pipetarea soluţiilor de substanţe toxice şi a lichidelor infestate se face cu pipete prevăzute cu bulă de siguranţă şi obligatoriu cu para de cauciuc pentru aspiraţie.

După utilizare, toate ustensilele şi resturile de produse vor fi sterilizate la etuvă sau autoclav şi numai după aceea vor fi spălate respectiv aruncate.

2. Manipularea sticlăriei

Vasele de sticlă utilizate la determinările practice nu trebuie să prezinte zgîrieturi, plesnituri, bule de aer incluse în masa sticlei sau alte defecţiuni. Incălzirea lor se face treptat, fie pe băi (de apă, de ulei, nisip), fie pe site de metal prevăzute cu placă de azbest pe toată porţiunea de contact între sită şi vasul de sticlă. Aparatura pusă la încălzit trebuieşte supravegheată permanent pe toată durata încălzirii.

Ustensilele fierbinţi se apucă după caz, cu o cîrpă uscată, cu un cleşte de lemn sau metalic. Ele trebuie ferite de şoc termic; în acest scop nu se vor aşeza pe locuri reci sau umede, nu se vor turna lichide reci în interior.

3. Manipularea dispozitivelor de încălzire

Intrucît majoritatea laboratoarelor folosesc încălzirea cu gaze naturale, pentru a evita accidentele trebuie respectate instrucţiunile de manipulare. Pentru a aprinde flacăra de gaz, se aprinde întîi chibritul în dreptul orificiului de ieşire a gazului apoi, se deschide treptat robinetul de gaz. Dacă becul de gaz se aprinde în interior, se închide imediat robinetul de la conducta de gaz.

Este interzisă aprinderea becurilor de gaz cu bucăţele de hîrtie răsucită, plimbate de la o masă de lucru la alta.

Nu se lasă niciodată becuri de gaz aprinse nesupravegheate. Intotdeauna, înainte de a părăsi laboratorul se controlează gazul.

4. Manipularea aparatelor de laborator cu acţionare electrică

Aparatele cu acţionare electrică trebuie montate şi exploatate în aşa fel, încît să fie prevenite electrocutările, arsurile, incendiile şi exploziile.

Aparatele de încălzire electrică (cuptoare,etuve,băi electrice)trebuie aşezate pe mese protejate cu tablă de oţel şi acoperite cu foi de azbest. Ele vor fi conectate la o priză de pămînt pentru evitarea electrocutărilor.

Nu este admisă legarea mai multor aparate electrice la o singură priză sau legarea în absenţa fişei.

Aparatele la care se observă scîntei sau care prezintă scurtcircuite nu vor fi utilizate decît după remedierea defecţiunii.

Conectarea aparatelor electrice la reţea se va face respectînd riguros condiţiile de voltaj indicate pe aparatul respectiv.

Instalaţiile electrice, precum şi aparatele electrice din laborator nu trebuiesc manipulate cu mîna umedă.

La terminarea lucrărilor se scoate din priză aparatura electrică, nu se lasă în priză decît aparatura electrică specială (termostat,frigider).

5. Manipularea substanţelor toxice,caustice şi inflamabile

Majoritatea accidentelor pot surveni la manipularea alco-

rectă a substanţelor chimice(reactivilor) corosive,toxice,inflamabile sau explozibile.Aşa de exemplu,deosebit de corosive sînt soluţiile concentrate de $NaOH$ şi KOH, soluţia concentrată de amoniac, acizii concentraţi (acidul clorhidric,acidul sulfuric,acidul azotic), perhidrolul, bromul.

Cînd se lucrează cu acizi concentraţi, substanţe corosive, toxice, manipularea lor se face numai sub nişă utilizînd mănuşi şi ochelari de protecţie.

La diluarea acidului sulfuric concentrat,se toarnă acidul în apă şi nu invers, încet sub agitare,utilizînd vase rezistente la şocuri termice, reacţia fiind puternic exotermă.

Soluţia de amoniac, acidul clorhidric şi azotic concentrat se vor turna numai sub continua ventilaţie a aerului.

O deosebită atenţie se cere la manipularea bromului.In acest caz experienţele se execută sub nişă.Ochii şi mîinile se vor feri de vaporii de brom prin utilizarea ochelarilor,respectiv a mănuşilor de protecţie.La turnare, se va scoate foarte atent picătura din gîtul flaconului pe marginea vasului, deoarece bromul se prelinge uşor pe sticlă şi poate provoca arsuri pe mîini, care se vindecă foarte greu.

Unii solvenţi organici prezintă o acţiune narcotică şi toxică, ca,de exemplu,cloroformul, eterul etilic;alţii sînt toxici ai sîngelui ca benzenul şi omologii săi,dereglatori ai sistemului nervos ca de exemplu alcoolul metilic sau ai metabolismului cum sînt hidrocarburile clorurate ;alţii sînt deosebit de volatili şi prezintă pericol de inflamabilitate(eterul etilic,eterul de petrol,benzenul).Din aceste motive se cere o deosebită atenţie la manipularea acestor lichide.

Nu se vor păstra în vase de sticlă, cantităţi de lichide inflamabile mai mari de un litru ; încălzirea lor în laborator se face în mod curent în vase metalice, în cantităţi pînă la 5 litri.

Dacă din întîmplare se varsă o cantitate oarecare de lichid inflamabil, se sting imediat toate becurile,se întrerup încălzitoarele electrice, se închid uşile şi se deschid ferestrele.Lichidul vărsat se va şterge cu o cîrpă, iar apoi prin stoarcere se colectează într-un balon cu dop.

In cazul aprinderii unui lichid inflamabil, în linişte,

fără panică trebuie întîi să se stingă becurile, să se acopere flacăra cu o pătură sau cu nisip ; concomitent cu operaţiile de stingere se scot din încăpere toate vasele cu substanţe inflamabile. Dacă flacăra nu se stinge, se cheamă pompierii, anunţîndu-i de la început ce substanţe anume au luat foc. Inainte de începerea operaţiilor de stingere, dacă sînt aparate electrice racordate la reţea, se va întrerupe curentul electric.

Alcoolul şi alte substanţe lichide solubile în apă, se pot stinge cu stingătoare cu spumă chimică, dioxid de carbon sau tetraclorură de carbon.

In caz că se aprinde îmbrăcămintea, este indicat ca persoana să nu alerge şi să se stingă prin învelire cu o pătură.

Distrugerea lichidelor inflamabile nerecuperabile, miscibile cu apa, se face prin aruncare la canal şi amestecarea cu o cantitate de apă care să asigure o diluare corespunzătoare. Lichidele inflamabile nemiscibile cu apa sau cu substanţe toxice în conţinut, nu se vor arunca la canal ci se vor împrăştia pe un teren viran.

IV. Măsuri de prim ajutor

In caz de accident, personalul laboratorului, în lipsa unui medic, trebuie să fie capabil să dea celui accidentat ajutorul de urgenţă.

Astfel, în caz de arsuri termice, superficiale sau profunde se recomandă pansamente cu alcool 60°. In caz de arsuri produse de substanţe chimice se spală plaga cu multă apă, după îndepărtarea în prealabil a îmbrăcămintei, apoi se va proceda după cum urmează : la arsuri produse de acizi se va spăla plaga cu o soluţie de bicarbonat de sodiu 2 % ; la arsuri produse de substanţe alcaline plaga se va spăla cu o soluţie 2 % de acid boric sau acetic, plăgile produse de brom se vor spăla cu benzen sau cu soluţie concentrată de tiosulfat de sodiu.

Cînd substanţele chimice au pătruns în ochi se va spăla ochiul cu apă multă, apoi se vor face spălături cu colir utilizînd un păhărel special de spălat ochii.

In cazul înghiţirii unor acizi puternici sau baze se vor introduce în stomac, substanţe neutralizante : bicarbonat de sodiu sau acid acetic. Dacă a survenit intoxicaţia, accidentatul va fi scos

din încăpere şi va fi culcat într-o cameră aerisită unde i se înlătură îmbrăcămintea din jurul toracelui şi gîtului spre a-i uşura respiraţia. In caz că nu mai respiră,i se va face respiraţie artificială, de preferinţă gură la gură.

In caz de electrocutare se întrerupe rapid curentul electric şi se scoate cît mai repede accidentatul din zona respectivă; în caz că nu se poate întrerupe curentul electric ,nu se pune mîna direct pe accidentat, ci cu ajutorul unor obiecte de îmbrăcăminte uscate se apucă bolnavul şi i se face respiraţie artificială.Bolnavul va fi apoi transportat la spital.

1. CENTRIFUGAREA

Prin <u>centrifugare</u> se înţelege operaţia de separare, datorită efectului forţei centrifuge, a componenţilor cu greutăţi specifice diferite dintr-o suspensie sau emulsie.

Aparatele cu ajutorul cărora se realizează centrifugarea se numesc <u>centrifuge</u>. In laboratoarele de biochimie se folosesc cel mai adesea centrifugele cu eprubete speciale, care se rotesc în jurul unui ax comun.

1.1. Unele aspecte teoretice ale centrifugării

Dacă o suspensie de particule se supune centrifugării în eprubetele introduse în rotorul fixat pe axul centrifugei, atunci particulele cu densitate, formă şi mărime diferită sedimentează cu viteze variate.

Viteza de sedimentare a unei particule depinde de acceleraţia centrifugă (a_{cf}) care este direct proporţională cu viteza unghiulară de rotaţie a rotorului (ω, în rad./s.) şi distanţa particulei de axa rotorului (r, în cm) :

$$a_{cf} = \omega^2 r \qquad (1.1)$$

Intrucît o singură rotaţie a rotorului reprezintă 2π radiani, viteza unghiulară a rotorului în rotaţii pe minut (U, rot./min.) se poate scrie astfel :

$$\omega = \frac{2\pi U}{60} ,$$

iar acceleraţia centrifugă va fi egală cu:

$$a_{cf} = \frac{4\pi^2 r U^2}{3600} \qquad (1.2)$$

Valoarea acceleraţiei centrifuge determinată cu ajutorul formulei (1.2) nu permite caracterizarea în mod comparabil şi reproductibil a condiţiilor de centrifugare, lucru deosebit de important atît pentru constructor cît mai ales pentru cercetătorul din laborator.

In prezent, acceleraţia centrifugă se exprimă ca multiplu al acceleraţiei gravitaţionale ($g = 980$ cm/sec^2) şi se numeşte acceleraţie centrifugă relativă (G), deci :

$$G = \frac{4\pi^2 rU^2}{3600.980}$$

sau $$G = 1,11.10^{-5}.r.U^2 \qquad (1.3)$$

Condiţiile esenţiale ale centrifugării pot fi reproduse şi la alte centrifuge, cu raza rotorului r diferită, dacă se indică G şi timpul de centrifugare. Pe baza ecuaţiei (1.3) V.P.Dole şi G.C.Cotzias au alcătuit o nomogramă (fig.1.1), care exprimă dependenţa între G şi U (viteza de rotaţie a rotorului în rot./min) şi r (distanţa în cm de la axa de rotaţie pînă la fundul sau mijlocul eprubetei, după cum centrifuga este cu eprubete mobile sau fixe).

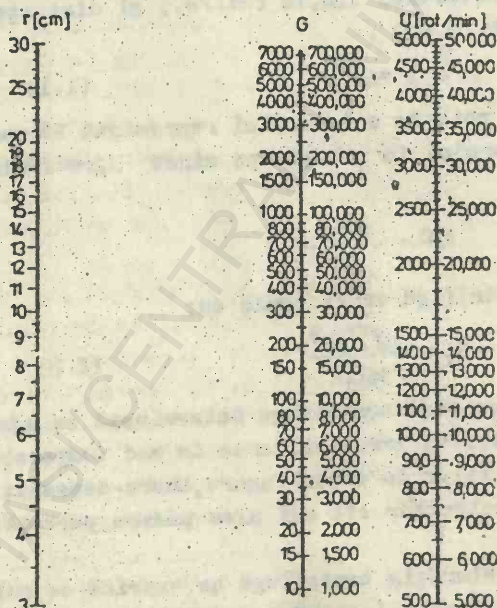


Fig.1.1. Nomogramă pentru calcularea numărului G

Pentru determinarea numărului G pe nomogramă se uneşte cu o linie dreaptă valoarea razei (r) şi viteza de rotaţie. Punctul de intersecţie al acestei drepte cu scara din mijloc dă valoarea

căutată a numărului G. Colcana stîngă a scării 3 corespunde părţii din stînga a scării vitezei de rotaţie, cea dreaptă părţii din dreapta.

Viteza de sedimentare a particulelor sferice depinde nu numai de acceleraţia centrifugă, dar şi de densitatea şi raza particulelor şi de vîscozitatea lichidului de suspendare.

La separarea substanţelor dintr-un amestec neomogen este necesar să se ia în calcul şi astfel de factori ca densitatea şi vîscozitatea mediului.

Viteza de sedimentare a unei macromolecule sau particule se exprimă prin aşa numitul <u>coeficient de sedimentare</u> (s) care se determină cu ajutorul relaţiei :

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x}$$

unde x-distanţa de la axa de rotaţie în cm, t-timpul în secunde, ω-viteza unghiulară în radiani/secundă. Ca unitate a coeficientului de sedimentare se consideră valoarea egală cu $1.10^{-13} \frac{cm}{sec} \cdot \frac{g}{dyn} = 1.10^{-13}$ sec. Această valoare se numeşte 1 <u>unitate Svedberg</u> , pentru care se foloseşte simbolul S. Coeficientul de sedimentare depinde de masa moleculară şi forma particulei, reprezentînd o valoare caracteristică pentru molecula sau structura macromoleculară dată. De obicei coeficienţii de sedimentare ai biopolimerilor se situiază în limitele de la $s= 0,25.10^{-13}$sec. sau s= 0,25S pînă la $s= 500.10^{-13}$sec. sau s= 500 S.

Viteza de sedimentare a unei substanţe depinde nu numai de proprietăţile moleculelor ei, dar şi de condiţiile de efectuare a experienţei : de densitatea, vîscozitatea şi temperatura solventului. Pentru a se putea compara coeficienţii de sedimentare ai diferitelor substanţe, se obişnuieşte să se raporteze aceşti coeficienţi la aşa numitele condiţii standard. Aceste condiţii se îndeplinesc dacă centrifugarea se realizează în apă la 20°C. Coeficientul de sedimentare raportat la condiţiile standard se desemnează prin $S_{20,w}$. Raportarea la condiţiile standard transformă într-un grad însemnat coeficienţii de sedimentare din valori variabile în constante caracteristice pentru specia dată de molecule. Insă mărimile constante reale se obţin atunci, cînd se elimină influenţa concentraţiei substanţei dizolvate asupra vitezei de sedimentare. Aceasta

se realizeză determinînd coeficienţii de sedimentare la concentraţii diferite ale substanţei,şi pe calea extrapolării grafice se efectuează raportarea datelor obţinute la diluţia infinită (la concentraţia zero).Valoarea obţinută astfel se numeşte <u>constantă de sedimentare</u> S^o, şi este specifică unei molecule.

In domeniile biologiei centrifugarea se foloseşte în scop preparativ şi analitic.

<u>Centrifugarea preparativă</u> constă în izolarea, separarea şi purificarea materialului biologic pentru cercetările biochimice ulterioare.Cu ajutorul centrifugării preparative se pot separa organitele celulare pentru studiul morfologiei,structurii şi activităţii lor biologice.Această metodă se utilizează de asemenea în obţinerea şi purificarea unor biopolimeri ca acizii nucleici şi proteinele.

<u>Centrifugarea analitică</u> are drept scop principal studiul proprietăţilor sedimentaţionale ale macromoleculelor biologice şi structurilor celulare.In acest caz sedimentarea macromoleculelor sau particulelor cercetate se realizează în centrifuge speciale cu o viteză de rotaţie de 30.000-70.000 rot./min. şi cu G avînd valori pînă la 500000 g.Centrifugările la viteze mai mari de 30000 rot./min. se numesc <u>ultracentrifugări</u> .

<u>Ultracentrifugarea analitică</u> permite determinarea greutăţilor moleculare ale macromoleculelor, verificarea omogenităţii preparatelor de acizi nucleici, proteine şi virusuri precum şi cercetarea schimbărilor conformaţionale care au loc în macromolecule biologice.

1.2.Centrifugarea preparativă

1.2.1.Centrifugarea diferenţială

Această metodă se bazează pe diferenţele de sedimentare a particulelor cu dimensiuni şi densitate diferite.Materialul de separat, de exemplu un omogenat tisular, se centrifughează aplicînd o creştere treptată a acceleraţiei centrifuge,care se alege astfel, încît în fiecare etapă pe fundul eprubetei să se depună o anumită fracţiune.La sfîrşitul fiecărui stadiu,sedimentul (precipitatul) se separă de lichidul supernatant (centrifugat) şi se spală de cîteva ori în scopul obţinerii unei fracţiuni cît mai pure posibil.

Centrifugarea diferenţială sau fracţionară este una din cele

mai răspîndite metode de obţinere a organitelor celulare din omogenatele tisulare.

Fracţiunile obţinute cu ajutorul centrifugării diferenţiale nu sînt absolut pure şi pentru separarea lor ulterioară se foloseşte centrifugarea în gradient de densitate.

1.2.2. Centrifugarea în gradient de densitate

Pentru crearea gradientului de densitate a soluţiilor se utilizează sărurile metalelor grele, de exemplu clorura de cesiu ($CsCl$), de asemenea soluţiile de zaharoză, uneori cu pH determinat.

Există două variante ale centrifugării în gradient de densitate. In cazul gradientului treptat de densitate în eprubeta de centrifugă se introduc, cu ajutorul pipetelor, cîteva soluţii a căror densitate scade succesiv. Apoi pe stratul superior al soluţiei cu densitatea cea mai mică, se agază proba de cercetat sub forma unui strat subţire. Prin centrifugarea eprubetei fiecare tip de macromolecule sau particule vor sedimenta de-a lungul gradientului de densitate cu o viteză caracteristică pentru ele (care este determinată în principal de masa particulelor) şi vor forma zone distincte.

A doua variantă a acestei metode se bazează pe gradientul liniar de densitate. In majoritatea cazurilor pentru crearea gradientului liniar de densitate se utilizează un dispozitiv special. Acesta este alcătuit din două vase cilindrice, de acelaşi diametru, care comunică între ele la partea inferioară, prin intermediul unui tub de sticlă cu robinet. Unul din vase, (vasul de amestecare) este prevăzut cu agitator şi are o conductă prin care soluţia curge în eprubeta de centrifugă. Soluţia cu densitatea maximă se introduce în vasul de amestecare, iar al doilea vas se umple cu soluţia de densitate minimă. Inălţimea coloanei de soluţie în cele două vase se stabileşte în aşa mod încît presiunea lor hidrostatică să fie identică. Soluţia cu densitatea mai mare se scurge treptat din vasul de amestecare în eprubeta de centrifugă, această soluţie fiind în acelaşi timp înlocuită cu un volum egal de soluţie cu densitatea minimă care vine din al doilea vas. Omogenizarea soluţiei în vasul de amestecare este asigurată prin agitarea constantă a soluţiei cu ajutorul agitatorului. Pe măsura scurgerii soluţiei în

eprubeta de centrifugă densitatea ei scade şi în eprubetă se creează astfel un gradient liniar de densitate.

Dacă în calitate de mediu, cu care se amestecă macromoleculele supuse centrifugării, se foloseşte o soluţie 6M de CsCl (alegerea este determinată de solubilitatea ridicată a CsCl şi vîscozitatea mică a soluţiilor ei concentrate),nu mai este necesar să se creeze în prealabil gradientul de densitate.In timpul centrifugării,însăşi CsCl se va sedimenta (întrucît ionii de cesiu posedă o masă mare),învingînd forţa de difuzie.La echilibru,în eprubete se crează un gradient de densitate de CsCl stabil.Macromoleculele din amestecul cu soluţia de CsCl se separă în zone diferite după densitatea lor, fiecare component fiind localizat în acea parte a eprubetei, unde densitatea lui este egală cu densitatea soluţiei de CsCl.Acest tip de centrifugare are o putere de rezoluţie foarte mare şi se foloseşte pentru separarea acizilor nucleici.

Poziţia diferitelor zone în care se separă amestecul de macromolecule la terminarea centrifugării în gradient de densitate, se determină fie cu ajutorul metodei optice, fie analizînd fracţiunile colectate prin sifonarea cu atenţie a conţinutului eprubetei sau prin orificiul ce se execută în fundul eprubetei.

1.3.Tipuri de centrifuge

In principiu, centrifugele se pot împărţi în mai multe tipuri, ce se diferenţiază între ele după particularităţile structurale, modul de funcţionare,posibilitatea de folosire etc.

La lucrările cu preparate biologice au o largă utilizare centrifugele cu eprubete ,care sînt de două tipuri : centrifuge cu eprubete mobile şi centrifuge cu eprubete fixe(tip unghiular).La centrifugele cu eprubete mobile,eprubetele sînt suspendate de arborele centrifugei, de care se depărtează în timpul rotirii tinzînd să ia o poziţie orizontală (fig.1.2.).In cazul centrifugelor unghiulare eprubetele sînt aşezate fix, oblic faţă de axa de rotaţie, de obicei sub un unghi de 20^{o}-35^{o} (fig.1.3)

După cum s-a subliniat în 1.1, viteza de sedimentare depinde de viteza de rotaţie.Centrifugele obişnuite de laborator dau o viteză maximă de 6000 rot./min. şi 6000 g.

Pentru laboratoarele de biochimie sînt absolut necesare cen-

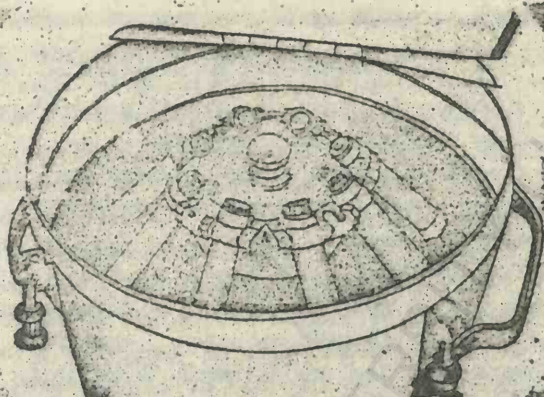


Fig.1.2. Centrifugă cu eprubete mobile

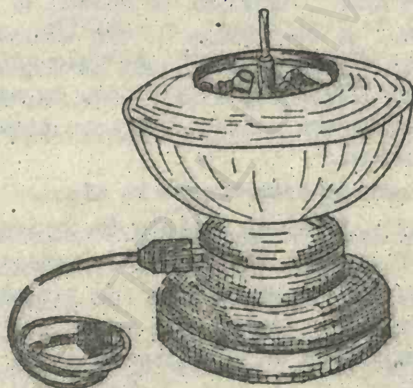


Fig.1.3. Centrifugă unghiulară

trifugele cu răcire, prevăzute cu un sistem de răcire pentru compensarea căldurii ce apare în urma frecării prin rotirea rotorului. La majoritatea acestor centrifuge serpentina de răcire este montată în carcasa de protecţie a rotorului. Centrifugele cu răcire, numite încă supercentrifuge, pot atinge o viteză maximă de 25.000 rot./min. şi o acceleraţie centrifugă relativă pînă la 39.000 g.

In afara centrifugelor descrise s-a reuşit să se construiască centrifuge cu o turaţie de 30.000-75.000 rot./min. şi cu G pînă la 510.000 g. Aceste centrifuge, numite ultracentrifuge sînt dotate

atît cu agregat de răcire cît şi cu instalaţie de vid, pentru a evita încălzirea rotorului prin frecarea cu aerul.

1.3.1.Reguli fundamentale în exploatarea centrifugelor

Modul de punere în funcţiune a unei centrifuge este detaliat în prospectul ce însoţeşte acest aparat.

Pentru a asigura o bună şi îndelungată funcţionare a centrifugelor se impune respectarea următoarelor reguli fundamentale :

1.Perechile de eprubete împreună cu conţinutul de centrifugat trebuie echilibrate exact.Echilibrarea se face cu lichidul care se centrifughează sau cu apă distilată.Lichidul se trece dintr-o eprubetă în alta cu o pipetă,pînă se obţine echilibrul perfect.Eprubetele echilibrate cîte două se introduc în rotor în poziţie simetrică.De obicei volumul probei are însemnătate pentru analiza ulterioară şi centrifugatul nu poate fi diluat.In acest caz fiecare eprubetă cu amestecul de centrifugat se echilibrează faţă de o eprubetă cu apă.Foarte comode sînt centrifugele obişnuite,prevăzute cu teci metalice sau din material plastic, în care se introduc eprubetele,pentru echilibrare se adaugă cîteva picături de apă direct în tecile respective.

2.Se interzice punerea centrifugei în mişcare fără capac de protecţie, sau scoaterea acestuia înainte de oprirea rotorului.

3.Centrifugele cu rotoare de schimb nu trebuie pornite niciodată fără rotorul montat fix pe antrenor.In caz contrar se îndoaie sau se rupe arborele elastic.

4.La punerea centrifugei în funcţiune trebuie să se respecte indicaţiile din prospect, şi să nu se depăşească o viteză de rotaţie a rotorului mai mare decît cea prescrisă, chiar dacă dispozitivele de pornire ar permite aceasta.

5.După terminarea lucrului la centrifugă,se scoate ştekerul din priză şi se curăţă rotorul şi carcasa de protecţie a acestuia.

Bibliografie :16,50

2.DIALIZA

Dializa este separarea unui amestec de substanţe pe calea difuziunii fracţionate printr-o membrană, sub acţiunea unui gradient de concentraţie. Crearea în soluţie a unui gradient de concentraţie a substanţei dizolvate, se poate realiza de exemplu, prin turnarea cu atenţie a apei distilate deasupra soluţiei apoase de proteină. In noua situaţie moleculele substanţei dizolvate se vor deplasa din domeniul cu concentraţia ridicată (stratul inferior) în domeniul cu concentraţia minimă (stratul superior) pînă cînd se stabileşte un echilibru pentru care aceste molecule se află în mod egal, deci dezordonat, răspîndite în întreg sistemul. Migrarea moleculelor substanţei dizolvate sub influenţa gradientului de concentraţie se numeşte difuziune. In urma difuziunii orice moleculă a substanţei dizolvate, după un timp cunoscut, se va mişca în direcţia zonei cu concentraţia minimă a acelei substanţe.

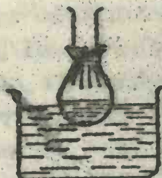
Dializa, ca proces de difuziune, este descrisă de prima lege a lui Fick, conform căreia cantitatea de substanţă dizolvată ds, difuzată în timpul de dializă dt prin aria membranei A perpendiculară pe sensul de răspîndire a substanţei, este proporţională cu gradientul de concentraţie dc/dx în acea direcţie :

$$\frac{ds}{dt} = -DA\frac{dc}{dx}$$

Constanta D se numeşte coeficient de difuziune. Coeficientul de difuziune se defineşte ca acea cantitate de substanţă dizolvată ce difuzează într-o secundă printr-o suprafaţă de 1 cm^2, cînd gradientul de concentraţie este egal cu unitatea. Intrucît difuziunea are loc în direcţia concentraţiei mai mici, înaintea părţii drepte a ecuaţiei de mai sus se pune semnul minus.

Membranele folosite pentru dializă pot fi confecţionate din colodiu, celofan, nitroceluloză sau acetilceluloză etc. Foiţele şi tuburile de celofan constituie unul din materialele cele mai folosite pentru dializă.

Cel mai simplu dispozitiv de dializă este sacul de celofan, care se obţine prin fixarea unei foiţe de celofan de o eprubetă cu aţă sau cu inel de cauciuc (fig.2.1). Se umple cel mult 2/3 din



volumul sacului cu soluţie şi se introduce într-un vas mai mare cu apă,preferabil curgătoare, astfel ca nivelul soluţiei ce se dializează să fie cu cîţiva milimetri deasupra nivelului apei.In prezent pentru dializa soluţiilor se folosesc tuburile de celofan,care adesea se leagă la ambele capete şi se suspendă într-un vas cu apă.

Fig.2.1.Dispozitiv de dializare

In timpul dializei are loc migrarea apei din spaţiul umplut cu apă pură, în spaţiul conţinînd soluţia de dializat, fenomen care poartă numele de <u>osmoză</u>.Ca urmare a acestui fenomen creşte conţinutul sacului sau tubului de celofan şi se dezvoltă o presiune osmotică ridicată ce poate duce la spargerea tubului.<u>Presiunea osmotică</u> reprezintă forţa necesară pentru a preveni mişcarea osmotică a apei.

Dacă sacul sau tubul de celofan nu se mişcă, dializa decurge încet.Viteza de dializă se poate mări mult prin agitare.De asemenea prin creşterea temperaturii dializa decurge mai repede, dar cu condiţia ca moleculele substanţei dizolvate să aibă o configuraţie stabilă.

Dializa se foloseşte în principal pentru îndepărtarea substanţelor micromoleculare, de exemplu săruri neutre,etanol din soluţiile de proteine sau alţi compuşi macromoleculari.Majoritatea membranelor biologice sînt nepermeabile pentru proteine,însă lasă să treacă liber apa şi moleculele neîncărcate ale substanţelor simple dizolvate.

<u>Bibliografie</u> :4,16

3. MASURAREA pH-ULUI

Apa pură disociază foarte slab punînd în libertate ioni de hidrogen şi ioni de hidroxil :



$$HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^- \quad (3.1)$$

In această ecuaţie apa joacă rolul de acid, fiind capabilă să cedeze protoni. Insă, apa poate funcţiona şi ca substanţă capabilă de a fixa protoni, adică ca bază, conform reacţiei :



$$H_2O + H^+ \rightleftharpoons H_3O^+ \quad (3.2)$$

Substanţele care pot avea comportare de acid şi de bază, în funcţie de partenerul cu care reacţionează se numesc amfoliţi.

Ionul de hidroniu H_3O^+ indică deci hidratarea protonului, care nu poate să existe liber în soluţii apoase. Din motive de simplificare în scrierea curentă, protonul hidratat se redă tot în mod simplu, adică prin H^+.

Aplicînd legea acţinnii maselor echilibrului (3.1) se obţine pentru constanta de echilibru K, relaţia (3.3) :

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[HOH]} \quad (3.3)$$

Cum echilibrul (3.1) este puternic deplasat spre stînga, gradul de disociere fiind foarte mic, concentraţia apei $[HOH]$ poate fi considerată practic constantă, iar expresia (3.3) se va scrie :

$$[H^+][OH^-] = K[HOH] = K_w \quad (3.4)$$

Constanta K_w se numeşte produsul ionic al apei sau constanta de autoprotoliză a apei. Pe cale experimentală se găseşte, la temperatura de 22°C, pentru constanta de disociere a apei valoarea $K = 1,8 \cdot 10^{-16}$.

Concentraţia molară a apei este $[H_2O] = \frac{1000.d}{18,016} = 55,43$ moli. Inlocuind aceste valori în relaţia (3.4) se obţine :

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H_2O] \cdot 1,8 \cdot 10^{-16} = 55,43 \cdot 1,8 \cdot 10^{-16} = 10^{-14} \quad (3.5)$$

Ultima relaţie arată că în apa pură concentraţia ionilor H^+ este egală cu concentraţia ionilor OH^- :

$$[H^+] = [OH^-] = \sqrt{K_w} = \sqrt{10^{-14}} = 10^{-7} \text{ mol/l} \quad (3.6)$$

Din motive practice S. Sörensen în anul 1909, a propus să se

exprime concentrația ionilor H^+ în forma logaritmică, introducînd noțiunea de exponent al ionului de hidrogen sau pH. In acest caz se poate scrie : $[H^+] = 10^{-pH}$, de unde se obține :

$$lg[H^+] = -pH.lg\ 10 = -pH \quad sau \quad pH = -lg[H^+] \qquad (3.7)$$

Deci pH-ul unei soluții este logaritmul negativ al concentrației ionilor de hidrogen(ionilor de hidroniu) din acea soluție.

In prezent, pH-ul se definește ca logaritmul negativ al activității ionilor de hidrogen :

$$pH = -lg\ a_{H^+} = -lg\ c_{H^+} . f_{H^+} \qquad (3.8)$$

Activitatea ionilor de hidrogen a_{H^+} se calculează înmulțind concentrația lor reală c_{H^+} în ioni-gram/l cu așa numitul coeficient de activitate f_{H^+}.

Coeficienții de activitate au în general, valori mai mici decît 1. In soluții diluate, valoarea acestui coeficient este apropiată de 1. In acest caz, activitățile ionilor sînt practic egale cu concentrațiile lor molare. De aceea ecuația (3.7) se utilizează mai frecvent.

In mod asemănător cu exponentul ionilor de hidrogen, se definește exponentul ionilor de hidroxil :

$$pOH = -lg[OH^-] = -lg\ a_{OH^-} \qquad (3.9)$$

Deoarece în apa pură pH = pOH = 7, rezultă că pH-ul caracterizează neutralitatea. Soluțiile cu pH<7 se numesc soluții acide, iar cele cu pH>7, bazice. Suma pH-ului și pOH-ului este constantă :

$$pH + pOH = -lg\ K_w = 14 \qquad (3.10)$$

Deci rezultă că pH = 14 - pOH sau pOH = 14 - pH

Reacțiile biochimice se petrec în soluții neutre, slab acide sau slab bazice. De valoarea pH-ului depind structura, unele proprietăți și activitatea macromoleculelor biologice, prin urmare funcțiile celulelor vii și comportarea organismelor. De aceea cunoașterea pH-ului este de o deosebită importanță în biochimie și biologie.

Determinarea pH-ului se face astăzi aproape exclusiv prin metode potențiometrice.

Metodele potențiometrice se bazează pe măsurarea tensiunii electromotoare a unei celule electrochimice compusă dintr-un electrod de măsură (electrod indicator al concentrației ionilor

de hidrogen) şi un electrod de referinţă ce se introduc în soluţia cu pH-ul necunoscut.

Potenţialul electrodului indicator este o funcţie determinată de pH-ul soluţiei cercetate, iar potenţialul electrodului de referinţă este constant.

Electrodul standard pentru toate măsurările de pH este electrodul de hidrogen. Acest electrod se compune dintr-o plăcuţă sau sîrmă de platină acoperită cu negru de platină, cufundată parţial într-o soluţie cu activitatea ionilor de hidrogen egală cu unitatea, prin care se trece hidrogen gazos la presiunea de 1 atmosferă. Prin convenţie, potenţialul electrodului de hidrogen este considerat egal cu zero la orice temperatură şi în orice mediu şi constituie etalonul primar la determinarea potenţialelor celorlalţi electrozi.

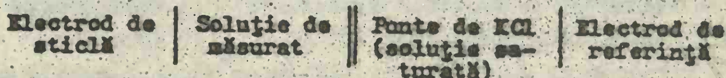
Datorită unei serii de greutăţi de ordin tehnic utilizarea electrodului de hidrogen chiar în calitate de standard este limitată, iar în măsurările de pH apar inconveniente încă mai mari din cauza reacţiilor chimice dintre hidrogenul gazos şi componenţii soluţiei de cercetat. Ca urmare, în măsurările curente de pH electrodul de hidrogen este înlocuit cu alţi electrozi indicatori ai activităţii ionilor de hidrogen, ca de exemplu electrodul de sticlă, electrodul de chinhidronă, electrodul de antimoniu. Dintre aceştia, electrodul de sticlă este cel mai utilizat. Electrodul de sticlă este alcătuit dintr-un vas tubular de sticlă ce prezintă la unul din capete o membrană, de obicei sferică, de sticlă cu o compoziţie specială. In interiorul vasului tubular se află un electrod de referinţă intern, introdus într-o soluţie tampon cu un pH constant.

Ca electrozi de referinţă sînt utilizaţi electrodul de calomel, electrodul de argint-clorură de argint şi în ultimul timp electrodul de amalgam de taliu-clorură de taliu (I). Electrodul de calomel are răspîndirea cea mai mare. Electrodul de calomel este format din mercur şi calomel (Hg_2Cl_2) în soluţie de clorură de potasiu.

O proprietate deosebită a electrozilor de referinţă este mica lor tendinţă de polarizare, ceea ce face ca potenţialul acestor electrozi să fie foarte stabil şi reproductibil.

De obicei, măsurarea potenţiometrică a pH-ului constă în de-

determinarea tensiunii electromotoare a celulelor electrochimice de următorul tip general :



Curenţii foarte slabi care străbat astfel de celule pot fi înregistraţi de instrumente care posedă o rezistenţă mare, deci consumă un curent neînsemnat în sistem, o putere mare a curentului ar cauza schimbări în concentraţia ionilor, prin urmare şi a pH-ului. In scopul amplificării tensiunii electromotoare au fost construite numeroase tipuri de aparate cu tuburi electronice numite pH-metre.

In general, astăzi se utilizează pe o scară mare pH-metrele cu deviaţie sau cu citire directă, care permit determinarea directă a forţei electromotoare şi deci a pH-ului, prin citirea deviaţiilor indicatorului unui instrument de măsură etalonat în prealabil în unităţi de pH sau în milivolţi.

In prezent există numeroase tipuri de pH-metre care prezintă perfecţionări remarcabile avînd drept scop creşterea preciziei şi gradului de reproductibilitate a măsurărilor de pH în cele mai diferite situaţii din laborator sau din uzină. In laboratoarele din ţara noastră sînt folosite pH-metrele MV 84 fabricate de firma Clamann-Grannert din R.D.G., pH-metrele daneze Radiometer etc.

Instalarea, punerea în funcţiune, modul de funcţionare şi de utilizare a pH-metrelor se efectuează, după indicaţiile din prospectul aparatelor respective. De aceea nu se va descrie amănunţit modul de lucru cu pH-metrele, ci se vor indica numai unele considerente de care trebuie să se ţină seama la etalonarea pH-metrului şi măsurarea pH-ului :

-Ansamblul pH-metrului (aparatul propriu zis) şi sistemul de electrozi, să se afle la aceeaşi temperatură, care se recomandă să fie temperatura camerei ;

-Se recomandă ca soluţiile tampon etalon utilizate la etalonarea pH-metrului şi soluţiile de măsurat să fie păstrate la aceeaşi temperatură.

-Tăria ionică şi pH-ul soluţiilor tampon etalon trebuie să fie cît mai apropiate de tăria ionică şi de pH-ul soluţiilor de măsurat cît şi de al soluţiei tampon din interiorul electrodului de sticlă.

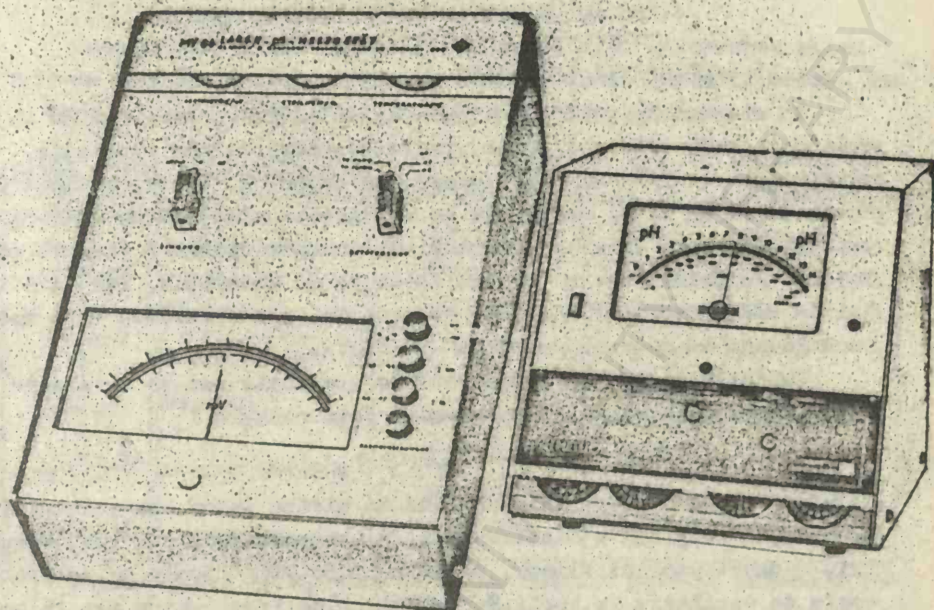


Fig.3.1.Vedere generală a pH-metrului MV 84 şi pH-METER 26

-Inainte de introducerea electrozilor în soluţia tampon etalon sau în soluţia de măsurat, ei se spală cu apă distilată şi se usucă apoi cu hîrtie de filtru.

-Manipularea electrozilor, se va face cu atenţie, evitîndu-se atingerea membranei sferice a electrodului de sticlă de fundul şi pereţii vasului cu soluţie.

<u>Bibliografie</u> : 9,26,27

4. FOTOCOLORIMETRIA SI SPECTROFOTOMETRIA

4.1. Principii teoretice

In starea energetică fundamentală electronii în atomi ca şi în molecule ocupă cele mai joase nivele de energie. Prin excitaţie, electronul trece pe un nivel energetic superior. Trecerea electronului de pe un nivel energetic pe altul este asociată cu absorbţia sau emisia unei anumite cantităţi de energie radiantă (cuantă sau foton). In primul caz se obţine spectrul de absorbţie, iar în al doilea caz, spectrul de emisie al atomului sau moleculei ce a interacţionat cu energia radiantă incidentă.

Variaţia de energie provocată de absorbţia sau de emisia de radiaţii electromagnetice se exprimă prin relaţia :

$$E = E_1 - E_2 = h\nu , \qquad (4.1)$$

unde E -energia absorbită sau emisă de sistem (atom sau moleculă), E_1-energia iniţială a electronului, E_2-energia finală a electronului, h-constanta lui Planck, egală cu $6,63 \cdot 10^{-34}$ joule.s , ν-frecvenţa de oscilaţie în herţi. Radiaţiile electromagnetice pot fi caracterizate fie prin lungimea de undă corespunzătoare, fie prin frecvenţa ν egală cu numărul de vibraţii în unitatea de timp, fie prin numărul de undă $\bar{\nu}$, egal cu numărul lungimilor de undă în unitatea de lungime. Toate aceste trei caracteristici se corelează prin relaţia :

$$\frac{1}{\lambda} = \bar{\nu} = \frac{\nu}{c} \qquad (4.2)$$

în care, λ= lungimea de undă a radiaţiei, c-viteza de propagare a luminii, egală cu $3 \cdot 10^8$ m/s şi $\bar{\nu}$ -numărul de undă, cm^{-1}.

Lungimea de undă, de obicei se măsoară în centimetri (cm), nanometri (nm) sau ångstrőmi (Å) : $1Å = 10^{-1}nm = 10^{-7}mm = 10^{-8}cm = 10^{-10}m$

Spectrul reprezintă dependenţa între cantitatea de energie absorbită sau emisă de sistem şi lungimea de undă.

O radiaţie compusă dintr-o singură lungime de undă se numeşte monocromatică. Marea majoritate a radiaţiilor electromagnetice sînt însă complexe, conţinînd un număr de radiaţii monocromatice, care au lungimi de undă cuprinse într-un interval foarte vast.

Substanţele interacţionează cu radiaţiile electromagnetice într-un diapazon larg de lungimi de undă şi de aceea spectrele lor se împart în mai multe domenii spectrale (Tabelul 4.1).

DOMENII SPECTRALE

Tabelul 4.1

Lungimea de undă		Denumirea domeniilor spectrale	Culorile domeniului vizibil		
cm	nm		Domeniul aproximativ (nm)	Culoarea	Culoarea complementară
10^{-6}	10^{-1}	Ultraviolet îndepărtat	400 - 450	violet	galben-verde
10^{-5}	10^{-2}		450 - 480	albastru	galben
		Ultraviolet	480 - 490	albastru-verde	oranj
10^{-4}	10^{-3}	Vizibil	490 - 500	verde-albastru	roşu
		Infraroşu apropiat	500 - 550	verde	purpur
10^{-3}	10^{-4}	Infraroşu	560 - 575	verde-galben	violet
			575 - 590	galben	albastru
10^{-2}	10^{-5}	Infraroşu îndepărtat	590 - 625	oranj	albastru-violet
10^{-1}	10^{-6}	Microunde	625 - 750	rosu	verde-albastru

Unele tipuri de spectre se obţin relativ uşor şi metodele corespunzătoare se folosesc curent în laboratorul de biochimie. Asemenea metode sînt spectrofotometria în vizibil şi ultraviolet. Alături de aceste metode optice, în studiul detaliat al biomacromoleculelor şi structurilor subcelulare au găsit o largă utilizare spectrofotometria în infraroşu, analiza prin fluorescenţă şi chemiluminiscenţă, rezonanţa electronică de spin şi rezonanţa magnetică nucleară, spectrometria de masă etc.

4.2. Interacţiunea luminii cu substanţa

Dacă un fascicul de lumină trece printr-un strat de substanţă omogen şi de aceeaşi grosime, intensitatea fluxului luminos slăbeşte. Raportul dintre intensitatea luminii care a trecut prin soluţie I_t şi intensitatea luminii incidente I_o se numeşte transmisie sau transmitanţa şi se notează cu T. Transmitanţa se exprimă de obicei în procente şi se modifică de la 0 pînă la 100 % :

$$T\ (\%) = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100 \qquad (4.3)$$

Logaritmul mărimii inverse transmitanţei poartă numele de extincţie E sau absorbanţă A :

$$E = A = \lg \frac{1}{T} = \frac{I_o}{I_t} \qquad (4.4)$$

Nu se recomandă folosirea termenului incorect de "densitate optică".

Intensitatea luminii care a trecut prin substanţă se modifică conform legii Bouguer-Lambert -Beer :

$$I_t = I_o . 10^{-\mathcal{E}cl} , \qquad (4.5)$$

unde $\mathcal{E}$-coeficientul molar de extincţie, c-concentraţia exprimată în moli/litru şi l-lungimea drumului străbătut de lumină prin soluţie sau grosimea stratului de soluţie,în cm.

Combinînd relaţiile (4.4) şi (4.5) obţinem :

$$E = \mathcal{E} cl \qquad (4.6)$$

Deci extincţia unei soluţii este proporţională cu concentraţia substanţei şi grosimea stratului soluţiei absorbante.Din (4.6) avem :

$$\mathcal{E} = \frac{E}{c.l} , \qquad (4.7)$$

adică coeficientul molar de extincţie $\mathcal{E}$ reprezintă extincţia unei soluţii avînd concentraţia de 1 mol/litru (M) ,citită într-o cuvă de 1 cm (drumul razei de lumină prin soluţie este de 1 cm).Dacă masa moleculară a unei substanţe nu se cunoaşte, se foloseşte coeficientul $\mathcal{E}^{1\%}_{1cm}$ care corespunde absorbţiei luminii de către un strat de 1 cm a unei soluţii conţinînd 1 % din substanţa analizată. Adesea este mai practic să se utilizeze coeficientul milimolar de extincţie ($\mathcal{E}_{mM}$) sau coeficientul micromolar de extincţie ($\mathcal{E}_{\mu M}$).

Coeficientul molar de extincţie reprezintă o constantă importantă a substanţei absorbante. Cunoscîndu-se $\mathcal{E}$ şi măsurîndu-se extincţia unei soluţii într-o cuvă cu grosimea dată,la o lungime de undă corespunzătoare, se poate găsi concentraţia substanţei respective în soluţie.

Coeficientul molar de extincţie variază în funcţie de lungimea de undă.Graficul dependenţei între $\mathcal{E}$ (sau E) şi lungimea de undă se numeşte curbă spectrală de absorbţie sau, mai puţin exact, spectrul de absorbţie al substanţei respective.In curbele spectrale se pot distinge benzi sau maxime de absorbţie care se caracte-

rizează printr-o intensitate determinată a absorbţiei şi o anumită lungime de undă. In analizele cantitative este avantajos ca banda de absorbţie să fie cît mai îngustă şi cît mai mare.

In practică mai întîi se trasează spectrul de absorbţie al substanţei, după care se aleg benzile de absorbţie adecvate pentru efectuarea analizei. Apoi se pregătesc o serie de soluţii standard cu diferite concentraţii ale substanţei şi se construieşte graficul dependenţei absorbţiei lor la anumite lungimi de undă. Pe curbele etalon se poate calcula concentraţia substanţei în soluţia de cercetat. Trasarea curbelor etalon, de asemenea, permite să se verifice condiţiile legii Bouguer-Lambert-Beer pentru substanţa respectivă. Această lege nu se aplică pentru toate sistemele. Intre cauzele abaterilor de la legea Bouguer-Lambert-Beer se numără : ionizarea probei sub acţiunea luminii absorbite, polimerizarea la concentraţii mari ale substanţei, prezenţa electroliţilor străini, schimbarea pH-ului în soluţia substanţei de determinat, lipsa caracterului monocromatic al radiaţiei etc.

Legea Bouguer-Lambert-Beer se află la baza unor metode larg folosite în analiza cantitativă : fotocolorimetria şi spectrofotometria.

4.3. Fotocolorimetria

Mulţi compuşi chimici, care absorb slab în domeniul vizibil, pot reacţiona cu alte substanţe dînd produşi coloraţi, a căror cantitate se corelează cu concentraţia compusului cercetat. Asemenea reacţii de culoare se folosesc pentru determinarea substanţelor respective cu ajutorul fotocolorimetriei. Această metodă de analiză se bazează pe măsurarea intensităţii radiaţiei luminoase care a trecut printr-o soluţie colorată. In fotocolorimetrie totdeauna se utilizează ca sursă de energie luminoasă "lumina albă", deci radiaţiile din spectrul vizibil fără prealabila separare monocromatică.

4.3.1. Aparate folosite în analiza fotocolorimetrică

Aparatele pentru aprecierea gradului de slăbire a intensităţii fasciculului luminos care a traversat soluţia colorată se numesc colorimetre. După sensibilitatea receptorului de lumină, se disting colorimetre cu recepţie vizuală şi colorimetre cu celulă

fotoelectrică sau fotocolorimetre. Colorimetrele vizuale se folosesc din ce în ce mai puţin şi de aceea nu le vom descrie, schema şi modul de funcţionare ale acestora găsindu-se în diferite manuale de lucrări practice.

Toate fotoelectrocolorimetrele funcţionează în general pe aceleaşi principii : fluxul luminos care a străbătut soluţia colorată, iluminează stratul sensibil al unei celule fotoelectrice, care transformă energia luminoasă în energie electrică. Fotocurentul care ia naştere se măsoară cu un galvanometru de sensibilitate mare. In cazul unor fotoelectrocolorimetre, scala galvanometrului este etalonată în unităţi de extincţie şi transmitanţă.

Celula fotoelectrică (fotoelement) reprezintă dispozitivul în care energia luminoasă este convertită în energie electrică. Funcţionarea fotoelementului se sprijină pe efectul fotoelectric, care constă în emiterea electronilor din atomii substanţei sub influenţa luminii. Intre intensitatea radiaţiei luminoase şi curentul fotoelectric dezvoltat de fotoelement există o proporţionalitate directă .

Pe lîngă folosirea celulelor fotoelectrice, sensibilitatea fotoelectrocolorimetrelor poate fi mărită prin măsurarea intensităţii coloraţiei soluţiilor în domenii limitate ale spectrului cu ajutorul filtrelor de lumină. Filtrele de lumină sînt medii care au o transmisie ridicată pentru un domeniu limitat al spectrului. Cele mai răspîndite sînt filtrele de sticlă colorată. La alegerea filtrului corespunzător trebuie să se asigure complementaritatea culorii acestuia cu culoarea soluţiei de cercetat (Tabelul 4.1).

Dintre fotoelectrocolorimetrele mai des întîlnite în laboratoarele din ţara noastră se numără fotocolorimetrul Lange, colorimetrul fotoelectric FEK-M etc.

4.3.1.1. Colorimetrul fotoelectric Lange model UK-VIII (fig. 4.1). Poate fi reprezentat schematic ca în fig. 4.2. Cele două fascicule de lumină emise de sursa luminoasă 1 (un bec de 6v/15w, alimentat de la reţeaua electrică de 220 v) devin paralele prin intermediul lentilelor 2 şi 3. Intre sursa luminoasă şi lentile se fixează cu suporturi filtrele optice 14 şi 15. Fasciculele de raze paralele străbat cuvele 4 şi 5 şi cad pe cele două fotoelemente 6 şi 7, cuplate în opoziţie (polul pozitiv al primului fotoelement este co-

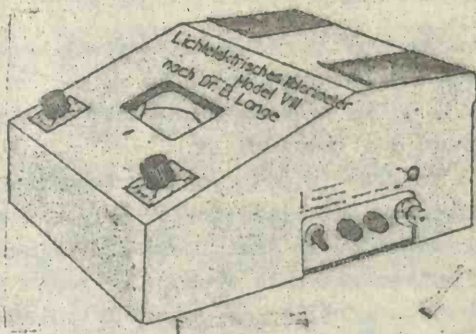


Fig.4.1.Aspectul exterior al colorimetrului fotoelectric Lange model UK VIII

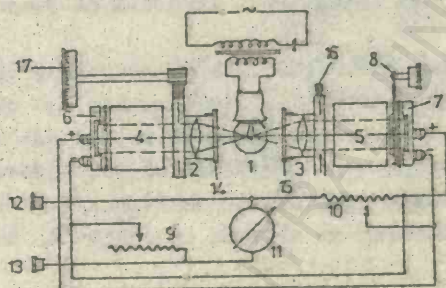


Fig.4.2.Schema colorimetrului fotoelectric Lange model UK VIII

nectat cu polul negativ al celuilalt fotoelement). Rezistenţele variabile 9 şi 10 facilitează ajungerea curenţilor formaţi la galvanometrul 11, utilizat ca instrument de nul. Curentul electric înregistrat de galvanometru este o mărime a intensităţii luminii care a traversat soluţia colorată. Cadranul galvanometrului indică extincţia (în roşu) şi transmisia procentuală (în negru). Pentru compensarea asimetriei dintre cele două celule fotoelectrice, în drumul razelor ce străbat cuvele 4 şi 5 se află diafragmele reglabile 16 şi respectiv 17. Aparatul mai este echipat cu placa opacă 8, prevăzută cu buton de comandă şi folosită pentru mascarea celulei 7.

Inainte de începerea măsurărilor, <u>aparatul se pune la punct</u>, efectuîndu-se următoarele operaţii :

1. Se controlează poziţia de zero a acului galvanometrului (în caz contrar se aduce la zero cu ajutorul unei şurubelniţe).

2. Se fixează între lampa 1 şi cele două lentile 2 şi 3, filtrele de culoare complementară culorii soluţiei de cercetat.

3. Cuvele cu solvent sau cu lichid de compensaţie se introduc în locaşurile lor.

4. Cele două potenţiometre 9 şi 10 se aduc în poziţia 2,5.

5.Se aprinde lampa 1, cu ajutorul întrerupătorului de pe partea laterală stîngă.

6.După 15 minute de la aprinderea lămpii,se eliberează acul galvanometrului, acționînd asupra întrerupătorului de pe partea laterală dreapta a aparatului.Se aduce acul galvanometrului la zero,reglînd deschiderea diafragmei 16, eventual 17.

7.Se acoperă fotocelula 7 cu placa 8,prin rotirea butonului de comandă al plăcii, şi cu ajutorul potențiometrelor 9 (Grob) şi 10 (Fein) se aduce acul galvanometrului la diviziunea 100.La descoperirea fotocelulei 7, acul galvanometrului trebuie să revină la zero.In caz contrar, se repetă operațiile de punere la punct a aparatului şi apoi se încep determinările.

Colorimetrarea probelor se execută în modul următor :

1.Se blochează acul galvanometrului, schimbînd întrerupătorul corespunzător în poziția "Ansengalvanom".

2.In cuva din dreapta (5) se înlocuieşte lichidul de compensație cu soluție de analizat.

3.Se deblochează acul galvanometrului.Prin introducerea probei de analizat în cuva 5, intensitatea fluxului luminos, ce cade pe fotocelula 7, scade datorită absorbției produsă de soluția colorată.Acul galvanometrului va devia proporțional cu intensitatea culorii, respectiv cu concentrația soluției de analizat.Pe scala superioară (roşie) a galvanometrului se citeşte extincția E, indicată de ac.

4.3.1.2.Fotoelectrocolorimetrul FEK-56M-U4.1

Acesta funcționează după principiul compensației optice a două fascicule luminoase, cu ajutorul unei diafragme variabile.Schema de principiu a aparatului este redată în fig.4.3.

Lumina de la lampa cu incandescență 1, trecînd prin filtrul luminos 2, este împărțită de prisma 3 în două fascicule: drept şi stîng.Intrucît sursa de lumină se află în focarul lentilelor 5, fasciculele luminoase ,reflectate de oglinzile 4, devin paralele. Mai departe, fasciculele paralele trec prin cuvele 6 şi ajung pe lentilele 8, în focarul cărora sînt instalate sticlele mate 11, iar, după ele fotoelementele 9,legate într-o schemă diferențială.

In calea fasciculului luminos drept pot fi introduse succesiv una sau alta din cele două cuve (cu soluție de cercetat şi cu

solvent).

Dacă nu se reuşeşte să se stabilească sensibilitatea necesară a aparatului sau se observă deviaţii însemnate ale acului microampermetrului, atunci în drumul fasciculelor luminoase se introduc absorbanţii 12.

Diafragma variabilă 10, amplasată în calea fasciculului luminos drept, prin intermediul tamburului gradat de care este legată, permite reglarea intensităţii luminii ce cade pe fotoelementul drept.

Diafragma glisantă 7, aşezată în calea fasciculului stîng, serveşte pentru slăbirea intensităţii fluxului luminos ce cade pe fotoelementul stîng.

Tamburul gradat din partea dreaptă a aparatului este pentru măsurare, iar cel din stînga pentru compensare.

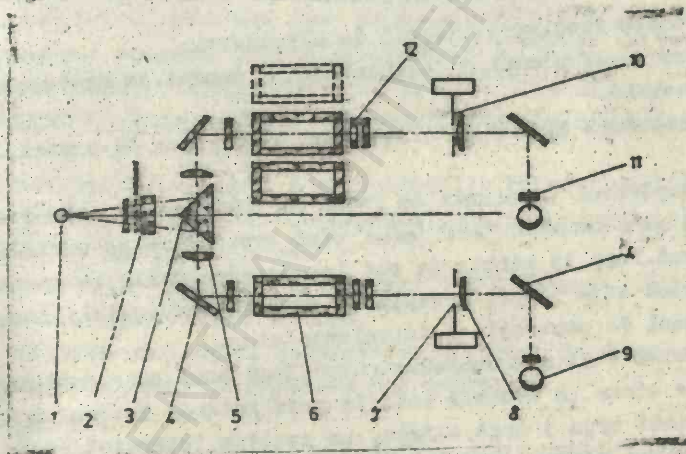


Fig.4.3.Schema optică a fotoelectrocolorimetrului FEK-56M-U4.1

Principiul măsurării constă în orientarea succesivă a fasciculelor luminoase iniţiale şi a celui ce a trecut prin soluţia de cercetat asupra fotoelementelor.

Pregătirea aparatului pentru lucru. Aspectul exterior al aparatului este prezentat în fig.4.4.

Alimentarea aparatului se realizează de la reţeaua de curent alternativ de 220 v, prin intermediul unui bloc de alimentare, cuprinzînd un stabilizator, un redresor şi o bobină de şoc, ceea ce

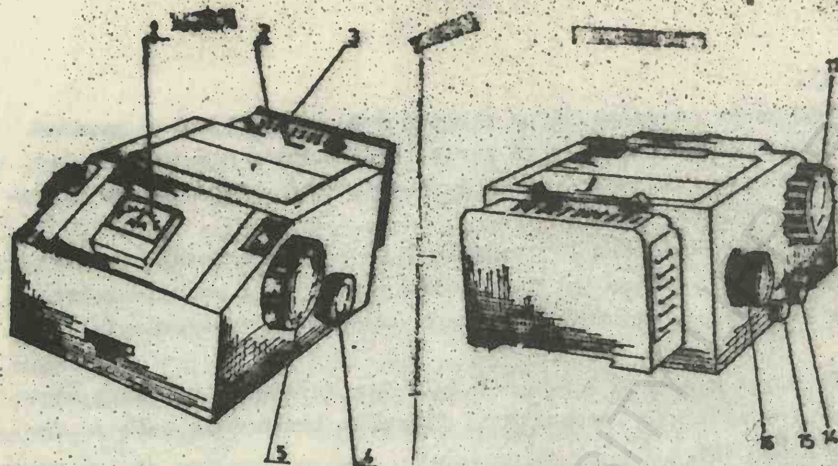


Fig.4.4.Aspectul exterior al fotoelectrocolorimetrului FEK-56M-U4.1

asigură constanţa încălzirii lămpii de iluminare.

1.Se racordează blocul de alimentare la aparat cu ajutorul unei fige speciale.

2.Se conectează blocul de alimentare la reţeaua de curent alternativ.

3.Intrerupătorul tensiunii de reţea al blocului de alimentare se deplasează spre indexul "Vkliuceno", cînd trebuie să se aprindă sursa luminoasă.După 15 minute se pot începe măsurările la aparat.

4.Deplasînd tija 3 spre dreapta se acoperă fasciculele luminoase cu ecranul de protecţie a fotoelementelor.

5.Se observă acul microampermetrului.Dacă acul este deplasat de la zero, se aduce la această poziţie prin rotirea butonului 15.

6.Se schimbă tija 3 spre stînga, pe poziţia "otkrîto" (deschis), îndepărtînd astfel ecranul din drumul fasciculelor de lumină.

7.Rotind tamburul 16 se introduce în drumul fasciculelor luminoase filtrul optic, care va fi folosit la analiza soluţiei de cercetat.

<u>Tehnica determinărilor fotocolorimetrice</u> cuprinde următoarele operaţii :

1.Se iau trei cuve de mărimi identice.In două din ele se toarnă solventul sau lichidul de compensaţie, iar în a treia soluţia

de cercetat.

2.In calea fasciculelor luminoase din stînga şi din dreapta se aşază cuvele cu solvent sau lichid de compensaţie.

3.Tamburul 5 din partea dreaptă a aparatului se fixează la diviziunea 1 pe scala transmisiei (scala neagră) şi se măreşte sensibilitatea microampermetrului, cu ajutorul butonului 14, pînă acul acestuia deviază cu 1-3 diviziuni.Măsurările se efectuează la această sensibilitate a aparatului.

4.Se stabilesc tamburele din dreapta şi din stînga la diviziunea zero pe scala roşie a extincţiei.

5.Cu ajutorul manetei 4 se introduce în drumul fluxului luminos din dreapta cuva cu soluţia de cercetat.Rotind tamburul 11 din stînga aparatului, se aduce acul microampermetrului la zero.Dacă nu se reuşeşte aceasta, atunci se montează în calea fasciculului luminos din dreapta absorbantul, menţionat la descrierea schemei de principiu a aparatului şi se încearcă din nou stabilirea acului la zero.

6.Prin rotirea manetei 4 se readuce în calea fluxului luminos cuva cu solvent (lichid de compensaţie).Acul microampermetrului deviază de la poziţia de zero.

7.Se roteşte tamburul de măsurare 5 din dreapta pînă acul microampermetrului revine la zero.

8.Valoarea extincţiei soluţiei de cercetat se citeşte pe scala roşie a tamburului de măsurare din dreapta.

Observaţii

1.Părţile componente ale sistemului optic trebuie ferite de praf şi contactul cu soluţiile de analizat.

2.Cuvele se folosesc numai în stare uscată şi curăţenie perfectă.In manipularea cuvelor se interzice atingerea cu mîna a feţelor pe care cade fluxul luminos.

4.3.2.Calcularea concentraţiei soluţiilor

Dacă soluţiile se supun legii fundamentale a fotoabsorbţiei şi există aparate cu ajutorul cărora să măsurăm slăbirea intensităţii fluxului luminos, după trecerea prin soluţia colorată, determinîndu-se valoarea extincţiei (E) sau transmisiei (T), se poate calcula concentraţia soluţiei, folosindu-se următoarele metode :

1).In condiţii standard se efectuează reacţia de culoare pentru o serie de soluţii etalon cu concentraţii diferite, dar cunoscute, ale substanţei cercetate, şi se măsoară E sau T.Apoi se construieşte aşa numita curbă de etalonare în coordonatele E(T)-concentraţie.

In cazul în care se respectă legea Bouguer-Lambert-Beer, punctele se situiază pe o dreaptă.Curba etalon se consideră reuşită atunci cînd 3-5 puncte se plasează pe dreapta respectivă.

Cînd trebuie să se determine concentraţia unei substanţe, se realizează reacţia de culoare,se măsoară extincţia soluţiei de cercetat şi pe curba etalon se află concentraţia necunoscută.

2).Se măsoară E(T) a unei soluţii etalon,care conţine o cantitate cunoscută de substanţă şi E(T) a soluţiei de concentraţie necunoscută.Folosind proporţionalitatea directă între extincţie şi concentraţie, se calculează concentraţia necunoscută după formula:

$$C_x = C_{et}\cdot\frac{E_x}{E_{et}}$$

în care :

C_x= concentraţia necunoscută a soluţiei de analizat;

C_{et}=concentraţia soluţiei etalon;

E_x =extincţia soluţiei de analizat;

E_{et}=extincţia soluţiei etalon.

4.4.Spectrofotometria

Metodele de analiză fotocolorimetrice şi spectrofotometrice se bazează pe aceeaşi lege generală a fotoabsorbţiei. Insă în spectrofotometrie, spre deosebire de fotocolorimetrie, se folosesc totdeauna radiaţii monocromatice de energie luminoasă, care pot proveni de la diferite surse de lumină.Aceasta dă posibilitatea ca în afară de domeniul vizibil (400-750 nm) să se lucreze, de asemenea, în domeniile ultraviolet (200-400 nm) şi infraroşu apropiat (750-1500 nm), ceea ce lărgeşte aria de utilizare a metodei spectrofotometrice.

Intre avantajele metodei spectrofotometrice se numără :

-metoda spectrofotometrică permite să se lucreze cu soluţii

"incolore" pentru ochi şi soluţii colorate în galben-pal ;

-metoda spectrofotometrică oferă posibilitatea ca determinările să se facă la lungimile de undă corespunzătoare maximelor curbelor de fotoabsorbţie, ceea ce măreşte considerabil sensibilitatea reacţiei chimice folosite, implicit exactitatea analizei în cazul concentraţiilor mici de substanţe.

4.4.1.Aparatura folosită în spectrofotometrie

Aparatele folosite în spectrofotometrie poartă denumirea de spectrofotometre. Cu ajutorul lor se poate măsură extincţia în funcţie de lungimea de undă sau la o lungime de undă dată.

Spectrofotometrele pot fi clasificate după mai multe criterii:

-domeniul din spectru (ultraviolet =UV, vizibil = V, infraroşu =IR)pentru care sînt destinate ;

-modul de aflare a rezultatelor măsurătorilor (spectrofotometrie manuală sau cu înregistrare automată) ;

-particularităţi constructive(spectrofotometrie cu monofascicul sau cu dublu fascicul) etc.

In cele ce urmează ne vom opri asupra a două aparate frecvent utilizate în laboratoarele de biochimie : spectrofotometrul Spekol şi spectrofotometrul VSU 2-P.

4.4.1.1.Spectrofotometrul Spekol este un aparat cu monofascicul, pentru domeniul vizibil. Schema de principiu a acestui aparat este dată în fig.4.5.

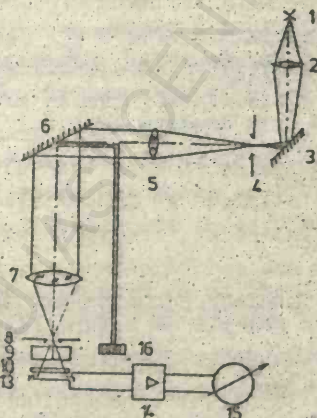


Fig.4.5.Schema optică a spectrofotometrului Spekol

Fasciculul luminos emis de sursa de radiaţie 1 ajunge prin intermediul lentilei condensatoare 2 la oglinda 3 care reflectă total radiaţiile către fanta de intrare în aparat 4.Sistemul optic 5 transformă radiaţiile luminoase în raze paralele şi le orientează spre monocromatorul cu reţea de difracţie 6, a cărui poziţie poate fi modificată cu ajutorul tamburului 16, gradat în nm.Tamburul 16 permite selectarea radiaţiei cu lungimea de

la care soluţia de cercetat prezintă maximum de absorbţie.

De la monocromatorul 6, fasciculul luminos este focalizat de lentila 7, către fanta de ieşire 8, apoi prin intermediul lentilei 9 este condus succesiv prin cuva cu soluţie de referinţă (solvent) 10 şi cuva cu soluţie de cercetat 11.Radiaţia care a străbătut soluţia este dirijată prin intermediul obturatorului 12 către fotoelementul 13, capabil să transforme energia radiantă în energie electrică.Aceasta, fiind amplificată de amplificatorul tranzistorizat 14, se poate citi la instrumentul de măsură 15, etalonat în extincţie şi transmisie procentuală.

Pentru atenuarea fluctuaţiilor de tensiune ale reţelei electrice, aparatul este prevăzut cu un stabilizator de tensiune care alimentează atît sursa de iluminare cît şi amplificatorul.

<u>Modul de lucru</u> la spectrofotometrul Spekol se poate rezuma astfel :

1.Se introduce în priză fişa stabilizatorului de tensiune şi se comută întrerupătorul stabilizatorului pe poziţia deschis (I) cînd se aprinde lampa sursei de lumină.Se lasă aparatul să se încălzească 10-15 minute.

2.Pe tamburul lungimilor de undă 16, se fixează lungimea de undă indicată în metoda folosită pentru determinare.

3.Clapa obturatorului de lumină 12 trebuie să fie orientată pe poziţia 0(închis).

4.In suportul pentru cuve se agază cuva cu soluţia de referinţă (solvent) şi cuva cu soluţie de analizat.Se introduce cuva cu soluţia de referinţă în drumul fasciculului luminos.

5.Acul indicator al instrumentului de măsură se corectează la zero pe scala transmisiilor (cea de jos), cu ajutorul butonului care are în dreptul său indicaţia 0 (din dreapta sus).

6.Se deschide obturatorul 12, trecînd clapa pe poziţia I. Acul indicator al instrumentului de măsură se aduce la valoarea 100, prin rotirea butonului care are în dreptul său indicaţia 100 (din dreapta, jos)

7.Se închide clapa obturatorului (poziţia 0).Prin deplasarea suportului pentru cuve se scoate cuva cu soluţia de referinţă şi se introduce cuva cu soluţia de studiat în calea fluxului luminos.

8.Se deschide clapa obturatorului în poziţia I.Se citeşte extincţia probei de cercetat pe scala superioară a instrumentului

de măsură. După efectuarea citirii se trece clapa obturatorului pe poziţia O (închis) pentru a evita uzarea fotocelulei.

4.4.1.2. Spectrofotometrul VSU-2-P ,produs de firma "Carl Zeiss",Jena,RDG este un aparat cu monofascicul, care serveşte pentru măsurători în domeniul ultraviolet (cînd se utilizează o lampă cu deuteriu),vizibil şi infraroşu apropiat (prin folosirea unei lămpi cu filament de wolfram).

Principiul de măsurare în cazul spectrofotometrului VSU 2-P se bazează pe compensarea potenţiometrică a fotocurentului. Schema optică a acestui spectrofotometru poate fi reprezentată ca în fig. 4.6.

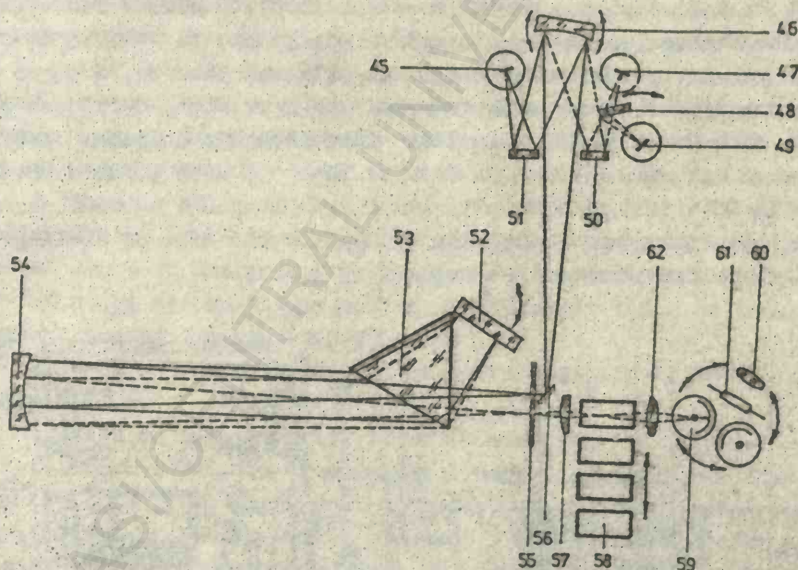


Fig.4.6. Schema optică a spectrofotometrului VSU 2-P

Lumina de la o sursă luminoasă cu spectru continu (lampa cu incandescenţă,45 sau lampa cu deuteriu ,47)este dirijată ,prin intermediul unui sistem de oglinzi, într-un monocromator cu prismă. Fasciculul luminos divergent trece prin fanta de intrare a mo-

nocromatorului şi cade pe oglinda concavă 54, care îl transformă într-un fascicul paralel.Acesta cade pe prisma de dispersie 53, care-l descompune spectral.După reflexia pe oglinda Littrow 52 radiaţia descompusă spectral traversează a doua oară prisma.Oglinda concavă 54 concentrează razele ieşite din prismă în planul ei focal unde se află şi fanta de ieşire a monocromatorului.Pentru o lăţime spectrală dată a fasciculului se obţine maximum de luminozitate dacă cele două fante, de intrare şi de ieşire,au deschideri egale.Fanta de intrare şi cea de ieşire sînt dispuse alături, reglarea deschiderii lor este cuplată şi se realizează prin rozeta 1 (fig.4.7), pe care se poate citi direct această deschidere. Numai radiaţiile de o anumită frecvenţă sînt focalizate exact pe fanta de ieşire şi pot părăsi monocromatorul.Celelalte radiaţii, cu alte frecvenţe, se focalizează în stînga sau în dreapta acestei fante şi sînt reţinute.Prin mişcarea oglinzii Littrow,în jurul unei axe paralele cu muchia refrigerentă a prismei, defilează pe rînd pe fanta de ieşire diferitele frecvenţe din domeniul ales. Mişcarea oglinzii Littrow se face cu ajutorul unui şurub micrometric 38 (fig.4.7),care permite stabilirea lungimii de undă pentru o anumită determinare.Lungimile de undă se pot citi pe scala gradată de pe fereastra de proiecţie 7 (fig.4.7).

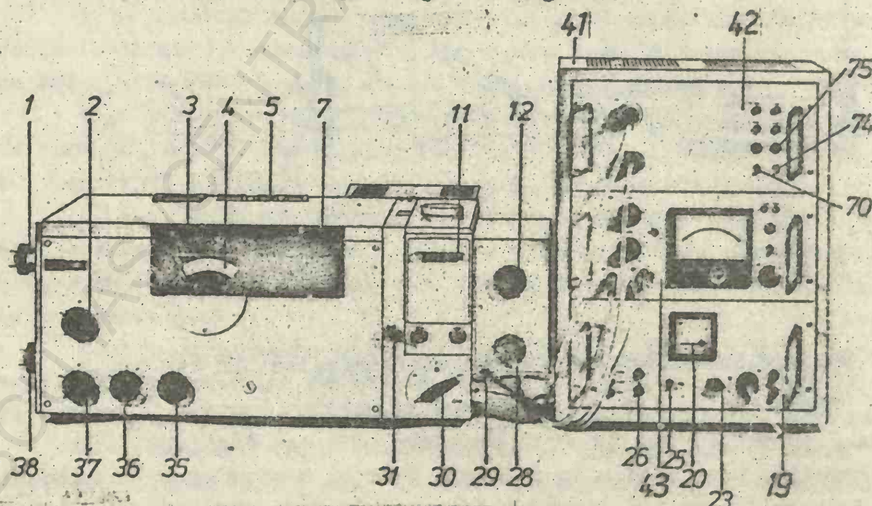


Fig.4.7.Aspectul exterior al spectrofotometrului VSU 2-P

In continuare, radiaţia monocromatică, ce părăseşte monocromatorul prin fanta de ieşire, este transformată de lentila 57 într-un fascicul paralel, care apoi trece pe rînd prin cuva cu dizolvant şi cuva conţinînd soluţia de analizat. Radiaţiile care părăsesc cuva sînt concentrate cu ajutorul lentilei 62 pe celula fotoelectrică 59. Fotocurentul care ia naştere se măsoară, prin compensare potenţiometrică, cu ajutorul unui galvanometru cu oglindă care are în circuit cuplat un amplificator electronic.

Modul de lucru la spectrofotometrul VSU 2-P

Punerea în funcţiune

1. Comutatorul pentru domeniile de măsurare "Mesbereich" 36 (fig.4.7) şi rozeta 1 a fantei S se fixează la zero.

2. Se conectează la reţeaua de curent alternativ (220) fişa stabilizatorului care furnizează tensiunea necesară pentru alimentarea sursei de lumină şi funcţionării dispozitivelor de măsură. Se trece întrerupătorul de la reţea, 74 pe poziţia I. Aprinderea lămpii de control 75 arată existenţa tensiunii de alimentare. Se recomandă să se lase instalaţia aprinsă 15 minute pentru stabilirea punctului zero al amplificatorului electrometrului.

3. Se alege sursa de lumină corespunzătoare, cu ajutorul comutatorului 31, care se fixează pe punctul albastru cînd se utilizează lampa cu deuteriu (pentru domeniul spectral ultraviolet, 200-380 nm) şi pe punctul roşu cînd se foloseşte lampa cu incandescenţă pentru domeniul 320-2700 nm.

4. Lampa cu deuteriu se cuplează prin comutatorul 70 al stabilizatorului.

5. Lampa cu incandescenţă se conectează prin comutatorul 25 al stabilizatorului, după ce mai întîi comutatorul 23 s-a fixat pe poziţia indicînd acţionarea externă a amplificării (punct în afara pătratului). La cuplarea comutatorului 25 se aprinde lampa de control 26s, care indică prezenţa tensiunii de alimentare. După cîteva secunde se aprinde lampa de control inferioară 26i şi instrumentul de măsură 20 indică curentul lămpii (circa 5 A).

6. Cu ajutorul comutatorului 12 (Zelenwechsel) se alege fotocelula cu sensibilitatea maximă, în funcţie de domeniul spectral:

Fotocelula MQVS cerc albastru 200-650 nm

Fotocelula MV cerc roşu 650-1100 nm

Fotorezistenţa PbS-B care alb 600-2700 nm
Fotorezistenţa PbS-B este o parte componentă a completului auxiliar pentru IR apropiat.

Reglarea punctului zero al amplificatorului

1. Schimbătorul de probe 30 se aduce pe poziţia D, iar comutatorul pentru domeniile de măsurare 36 pe poziţia I.

2. Spotul galvanometrului, care se observă pe sticla mată 3, se reglează între repere cu ajutorul potenţiometrului dublu pentru reglare grosieră (tamburul mic) şi fină (tamburul mare) de nul (Nullpunkt) 28.

3. Se deplasează succesiv comutatorul pentru domeniile de măsurare 36 în poziţiile II, III, şi IV şi se efectuează reglarea grosieră şi fină a instrumentului de nul.

Reglarea punctului zero al galvanometrului

Schimbătorul de probe 30 se aduce pe poziţia L şi dacă spotul galvanometrului, nu se găseşte între repere, se înlătură deviaţia existentă cu ajutorul reglatorului mecanic de zero. Reglarea se realizează prin mişcarea şaibii de poziţie 5, cu o monedă. In caz de deviere se corectează din nou punctul zero al amplificatorului.

Reglarea curentului de întuneric

1. Schimbătorul de probe 30 se potriveşte pe poziţia D.

2. Comutatorul pentru domeniile de măsurare 36 se roteşte pe poziţia I. Cu ajutorul potenţiometrului dublu 28 se reglează spotul galvanometrului între repere.

3. Se apasă cu intermitenţă pe tasta de măsurare 29. Deviaţia spotului galvanometrului pe scala 3 este compensată cu ajutorul compensatorului curentului de întuneric D (2, fig. 4.7).

4. Prin învîrtirea comutatorului domeniilor de măsurare 36 de la I la IV, se ridică sensibilitatea indicatorului şi se efectuează compensarea curenţilor de întuneric, aceasta fiind mai exactă pe IV.

La terminarea reglării, comutatorul 36 se pune pe I.

Egalizarea valorii de gol

1. Cuvele umplute cu soluţii sînt introduse în carcasa cuvelor care se împinge la locul ei. Cuva cu solvent (lichid de compensaţie) se agază în compartimentul L, iar cuvele cu probe în

M_1,M_2,M_3.Schimbătorul de probe 30 se pune pe L.Potenţiometrul de măsură 31 se reglează la zero.

2.Se alege lungimea de undă dorită pe scala 7,cu ajutorul rozetei λ,38.

3.Se dă o anumită valoare potenţiometrului valorii de gol L, 37,fixînd butonul mic(grosier) între diviziunile 5-6,iar butonul mare(fin) la diviziunea 10.

4.Se tatonează pe butonul de măsurare 29 şi se deschide treptat fanta S,1 pînă spotul galvanometrului revine între repere. Reglarea fină a spotului galvanometrului se realizează cu butonul mare al potenţiometrului 37.

Egalizarea valorii de gol se continuă pînă la treapta IV a comutatorului pentru domeniile de măsurare 36,după care se trece pe poziţia I.

5.O egalizare a valorii de gol trebuie efectuată după fiecare schimbare a lungimii de undă sau a probei.

Măsurarea extincţiei probei

1.Schimbătorul probelor 30 se comută pe poziţia M_1,pentru a introduce în drumul razelor luminoase proba de măsurat.

2.Se apasă pe butonul de măsurare 29.Spotul galvanometrului se aduce între repere,prin rotirea potenţiometrului de măsurare 35.

3.Se citeşte extincţia probei pe scala roşie 4.

4.Dacă deviaţia spotului galvanometrului nu se poate compensa,se trece pe domeniul de măsurare II.Palpînd butonul de măsurare 29,se continuă compensarea cu potenţiometrul de măsurare 35 pînă spotul galvanometrului revine între repere şi se citeşte extincţia probei.

5.La fel se procedează cu probele M_2 şi M_3.După citirea extincţiei probei,comutatorul 36 se schimbă pe poziţia O.

4.4.2.Aplicaţii ale spectrofotometriei

Spectrofotometria în domeniile UV şi vizibil se foloseşte pentru identificarea combinaţiilor chimice pure cît şi a celor din constituţia preparatelor biologice.

In biochimie,metoda spectrofotometrică de analiză şi-a găsit o largă utilizare pentru determinarea cantitativă a o serii

de compuşi chimici ce intră în compoziţia materiei vii,cum ar fi acizii nucleici,proteinele,enzimele,hormonii etc.

Determinarea spectrofotometrică a compuşilor biochimici se poate realiza prin trei procedee : cu ajutorul unei curbe de etalonare,cu ajutorul unui standard la fiecare serie de analize şi pe baza coeficientului molar de extincţie.

Primele două procedee sînt asemănătoare cu cele descrise la fotocolorimetric(4.3.2),ele aplicîndu-se atît substanţelor care absorb la anumite lungimi de undă cît şi celor care reacţionează cu reactivi specifici dînd derivaţi coloraţi.

Dacă măsurătorile se fac în condiţiile în care legea Bouguer-Lambert-Beer este respectată,atunci se poate folosi pentru calculul concentraţiei substanţei cercetate coeficientul molar de extincţie,pe baza ecuaţiei :

$$E = \varepsilon . c . l, \qquad (4.6)$$

$$\text{din care} \quad c = \frac{E}{\varepsilon . l}, \qquad (4.8)$$

<u>Bibliografie</u> : 5,9,12,22,24,38,40,50

5. CROMATOGRAFIA

5.1. Principii generale

Intre metodele de separare a amestecurilor complexe de combinaţii biochimice, a căror proprietăţi fizice şi chimice sînt foarte apropiate, un loc de o deosebită importanţă îl ocupă metodele cromatografice.

Termenul de cromatografie (kroma-culoare, grafein-a scrie) a fost introdus de botanistul rus Ţvet, în urma experimentului clasic privind separarea substanţelor colorate din frunzele de plante, pe o coloană de carbonat de calciu, efectuat la începutul secolului nostru (1903). Ulterior, experienţa lui Ţvet a fost reluată şi completată de numeroşi cercetători, ceea ce a determinat dezvoltarea cromatografiei într-un ritm susţinut şi apariţia unei game de metode cromatografice.

Cromatografia poate fi definită ca o metodă fizico-chimică de analiză bazată pe vitezele diferite de deplasare a substanţelor dizolvate în sistemul a două faze : faza fixă sau staţionară şi faza mobilă sau purtătoare, efect care are drept rezultat separarea componenţilor chimici respectivi în zone sau benzi distincte. Se poate considera că la baza mecanismului, implicat în deplasarea şi expansiunea zonei cromatografice, se află alterarea continuă a echilibrului de repartiţie a substanţei solubile între cele două faze datorită migrării fazei mobile şi compensaţia simultană a acestei alterări pe calea difuziei. Intrucît sînt transportate numai acele molecule ale substanţei cromatografiate , care se găsesc dizolvate în faza mobilă, viteza de deplasare a zonei cromatografice este proporţională cu probabilitatea aflării moleculelor substanţei respective în faza mobilă.

Repartiţia unei substanţe între faza staţionară şi faza mobilă depinde de aşa numita constantă de distribuţie (repartiţie) K , care se exprimă prin raportul :

$$K = \frac{\text{concentraţia substanţei (mol/unitatea de volum) în faza staţionară}}{\text{concentraţia substanţei (mol/unitatea de volum) în faza mobilă}} \qquad (5.1)$$

Prin termenul de constantă efectivă de distribuţie (k) se desemnează raportul între cantitatea totală de substanţă într-o fază, şi cantitatea totală a substanţei date în cealaltă fază ; cu alte cuvinte, constanta efectivă de distribuţie reprezintă produsul constantei de repartiţie a substanţei cu raportul volumelor fazei staţionare (V_s) şi fazei mobile (V_m).

$$k = K.V_s / V_m \qquad (5.2)$$

Eficacitatea metodelor cromatografice se datoreşte constantelor de distribuţie diferite ale componenţilor dintr-un amestec dat în cele două faze ale sistemului cromatografic.

După natura proceselor fizico-chimice pe care se bazează distribuţia între faza fixă şi faza mobilă a substanţei supusă cromatografiei, metodele cromatografice pot fi clasificate în :

a) Cromatografia de adsorbţie în care se realizează un echilibru de adsorbţie a substanţei cromatigrafiate între faza fixă solidă şi faza mobilă lichidă ;

b) Cromatografia de repartiţie este o tehnică în care substanţa supusă analizei se repartizează între faza fixă lichidă sau semilichidă (lichid imobilizat pe un suport solid) şi faza mobilă lichidă, cele două faze fiind nemiscibile între ele. Intre metodele cromatografiei de repartiţie se încadrează cromatografia pe hîrtie.

c) Cromatografia de schimb ionic, se bazează pe schimbul reversibil de ioni între faza staţionară, solidă, purtătoare a unor grupări ionizabile acide sau bazice şi componenţii probei luate în consideraţie. Faza mobilă este o soluţie apoasă de săruri neutre în tampoane cu concentraţii şi pH-uri diferite.

d) Cromatografia de excludere în gel, constituie o metodă bazată pe efectele neionice de "sită moleculară" sau "cernere moleculară", asigurînd separarea substanţelor după dimensiunile moleculelor acestora.

e) Cromatografie în fază gazoasă este denumită cromatografia în care substanţele de separat pot fi vehiculate de un gaz. In acest caz, faza staţionară poate fi un adsorbant solid sau lichid nevolatil impregnat pe un suport inert.

f) Cromatografia de afinitate, reprezintă o metodă de purificare a biopolimerilor activi, bazată pe proprietatea caracteris-

tică a acestora de a se lega selectiv şi reversibil cu alte substanţe faţă de care manifestă o înaltă specificitate biologică şi prin urmare şi afinitate.

5.2. Cromatografia pe hîrtie

5.2.1. Principiul metodei

Această metodă este foarte eficace şi accesibilă, permiţînd separarea şi analiza unor cantităţi foarte mici (de ordinul microgramelor) de substanţe.

Mecanismul cromatografiei pe hîrtie constă în repartiţia diferită a componenţilor din amestec între faza staţionară şi faza mobilă, de obicei organică. In acest caz, faza staţionară este constituită din hîrtie de filtru specială (de tip Whatman sau Schleicher-Schüll) şi lichidul fixat pe ea. Hîrtia cromatografică posedă capacitatea de a absorbi şi fixa apa între fibrele celulozice. Această apă conţinută de hîrtia de filtru poate fi privită, de fapt, ca fază staţionară.

Intr-un punct situat pe <u>linia de start</u> de pe banda de hîrtie cromatografică se aplică soluţia de analizat. După uscarea soluţiei, hîrtia este imersată, cu capătul apropiat de locul unde s-a aplicat soluţia, într-un vas cu faza mobilă. Intregul ansamblu se va introduce într-o incintă închisă (cameră cromatografică) saturată cu vaporii celor două faze (pentru ca să nu poată avea loc o evaporare a acestora, care să modifice compoziţia sistemului de solvenţi). Faza mobilă va trece datorită capilarităţii peste punctul de aplicare a soluţiei, migrînd de-a lungul hîrtiei şi provocînd deplasarea substanţelor din probă. Moleculele substanţelor din amestec se distribuie între cele două faze în conformitate cu constantele lor de repartiţie. Cu cît este mai mare solubilitatea unei substanţe în faza mobilă cu atît ea se va deplasa împreună cu solventul mai departe pe hîrtie, şi invers.

După ce a avut loc separarea cromatografică, banda de hîrtie se usucă mai întîi la temperatura camerei într-o nişă bine ventilată şi apoi la etuvă.

Substanţele separate pe hîrtie sînt puse în evidenţă prin reacţii de culoare. Hîrtia cromatografică pe care s-au localizat zonele (spoturile) substanţelor din amestec se numeşte <u>cromatogramă</u>.

Mobilitatea şi poziţia substanţelor pe cromatogramă se caracterizează prin valoarea R_f ,care este raportul dintre distanţa d străbătută de zona substanţei respective faţă de linia de start şi distanţa D străbătută de frontul solventului faţă de linia de start (fig.5.1) :

$$R_f = \frac{d}{D} \quad (5.3)$$

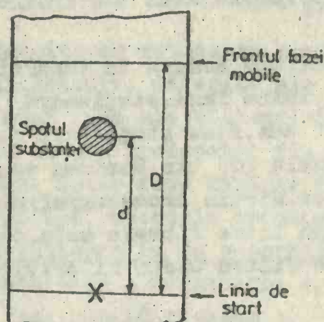


Fig.5.1.Deplasarea zonei substanţei şi a frontului solventului pe cromatogramă

In condiţii experimentale standardizate,valoarea R_f este o constantă caracteristică pentru o substanţă dată.

5.2.2.Tehnici cromatografice

Cromatografia pe hîrtie se poate realiza în mai multe variante tehnice.In procedeul ascendent, migrarea solventului se face de jos în sus, în sens contrar forţei gravitaţionale, prin ascensiune capilară.Faza mobilă se poate turna direct pe fundul vasului.In cazul unor vase mai mari,pentru a nu se consuma cantităţi prea mari de solvent, acesta se toarnă în cuve aşezate pe fundul vasului.

In tehnica descendentă,faza mobilă migrează de sus în jos,în sensul forţei de gravitaţie.Capătul fîşiei de hîrtie cu proba aplicată se imersează în faza mobilă conţinută într-o cuvă fixată la partea superioară a camerei cromatografice.

In ambele procedee, atmosfera din camera cromatografică se saturează cu vapori de solvenţi,punînd pe fundul vasului recipiente care conţin cele două faze.

Una dintre cele mai vechi şi răspîndite tehnici în cromato-

grafia pe hîrtie este tehnica circulară. Hîrtia tăiată sub formă de rondele sau pătrate se așază orizontal, iar faza mobilă migrează radial, din centru spre margine. Probele de analizat se aplică în diferite puncte ale unui cerc avînd un diametru de 1-5 cm. Alimentarea cromatogramei cu solvent se poate face introducînd în centrul acesteia un fitil obținut prin răsucirea unei fîșii de hîrtie.

Procedeele în care migrarea fazei mobile se face într-o singură direcție aparțin cromatografiei unidimensionale.

Cromatografia pe hîrtie se poate efectua și după tehnica bidimensională. In acest caz proba de analizat se pipetează într-un colț al foii de hîrtie tăiată sub formă de pătrat. Faza mobilă migrează într-o direcție, apoi se scoate hîrtia din camera cromatografică, se usucă și se cromatografiază în alt sistem de solvenți, în direcție perpendiculară pe direcția primei migrări. Cromatografia bidimensională permite o separare mai eficace a substanțelor decît cea unidimensională.

Pentru identificarea substanțelor separate pe cromatogramă se folosesc diferite metode : iradierea în lumină ultravioletă (fluorescența), absorbția în ultraviolet, pulverizarea cu reactivi specifici de culoare, metode enzimatice și biologice etc.

Determinarea cantitativă a componenților din amestecul cromatografiat se poate face direct pe hîrtie sau în eluatele obținute prin extracția substanțelor de pe cromatogramă.

Bibliografie : 8,28,31,30

6. ELECTROFOREZA

6.1. Principii generale

Multe substanţe cu importanţă biologică, ca de exemplu, aminoacizii, peptidele, proteinele, acizii nucleici etc., conţin în moleculele lor grupări ionizabile. Asemenea molecule posedă sarcini electrice libere şi pot exista fie sub formă de cationi (+), fie sub formă de anioni (-). Dacă în soluţia uneia din substanţele menţionate vor fi introduşi doi electrozi şi se va trece un curent electric constant, atunci moleculele substanţei respective se vor mişca spre polul cu sarcină electrică de semn contrar sarcinii lor. Acest fenomen de migrare a moleculelor încărcate electric, sub influenţa unui cîmp electric constant se numeşte electroforeză.

Viteza de migrare a cationilor spre catod (electrodul legat de polul negativ al unei surse de tensiune) şi anionilor spre anod (electrodul legat de polul pozitiv al sursei) depinde de raportul dintre forţa F exercitată de cîmpul electric asupra ionilor respectivi şi forţa de întîrziere F^1 (manifestată printr-o interacţie între moleculele substanţei şi mediul înconjurător, în care sînt implicate mai ales forţele de frecare şi forţele electrostatice). Forţele F şi F^1 tind să se egaleze, iar din condiţia de echilibru se poate obţine viteza de migrare v a unei particule sferice izolate printr-un fluid supus acţiunii cîmpului electric :

$$v = \frac{H.Q}{6\pi r.\eta}, \qquad (6.1)$$

în care H-intensitatea cîmpului electric ;

Q-sarcina electrică a particulei ;

r-raza particulei ;

η-vîscozitatea mediului.

Substanţa supusă electroforezei se dizolvă sau se suspendă într-o soluţie tampon. Cu aceeaşi soluţie tampon se umectează şi suportul pentru a facilita trecerea curentului electric. In soluţia între cei doi electrozi, curentul este transportat de ionii tamponului şi probei de analizat, iar în restul circuitului de către electroni. Curentul în sistem se menţine pe seama electrolizei

care are loc la electrozi, fiecare din ei fiind imersat într-o cameră cu tampon. In timpul electrolizei la catod se formează ioni de hidroxil şi hidrogen molecular, iar la anod oxigen molecular şi protoni :



$$\text{catod} : 2e^- + 2H_2O \longrightarrow 2\,OH^- + H_2\uparrow$$



$$\text{anod} : H_2O \longrightarrow 2H^+ + 1/2\,O_2 + 2e^-$$

Formarea la catod a ionilor hidroxil determină disocierea componentei tamponului (HA), care reprezintă un acid slab. Ca urmare creşte cantitatea ionilor A^-, conducînd curentul spre anod. La anod ionii A^- se unesc cu protonii, formîndu-se din nou HA, iar electronii intră în circuitul electric. Fiecare cameră cu tampon pentru electrod, comunică prin intermediul unui orificiu sau al unui fitil cu o altă cameră în care se află suportul pe care are loc migrarea. Cele două camere se separă între ele pentru ca schimbarea pH-ului la electrod să influenţeze cît mai puţin tamponul cu care este saturat suportul.

După un timp de trecere a curentului prin sistem, înainte ca ionii substanţei cercetate să ajungă la electrozi, componentele din amestec se vor separa în concordanţă cu mobilitatea lor electroforetică. Aceasta depinde de o seria de factori, între care se menţionează următorii :

1. Sarcina sumară a moleculelor încărcate electric ;
2. Dimensiunile şi forma moleculelor, care pot influenţa forţele de frecare şi interacţiunile electrostatice ;
3. Parametrii cîmpului electric ce se corelează prin ecuaţia:

$$I = \frac{V}{R}, \qquad (6.2)$$

unde : I-intensitatea curentului, în amperi
V-tensiunea, în volţi şi
R-rezistenţa (în ohmi).

Asupra separării ionilor în cîmpul electric influenţează toţi aceşti trei factori.

Intrucît în soluţie curentul între electrozi este condiţionat de transportul ionilor tamponului şi substanţei de analizat, viteza lor de migrare este direct proporţională cu intensitatea curentului. Lungimea drumului străbătut de ioni va fi proporţiona-

lă cu timpul de trecere a curentului .De aceea ,pentru o reproducere cît mai exactă a rezultatelor ,intensitatea curentului în timpul electroforezei nu trebuie să varieze.

Viteza de migrare a ionilor este proporţională cu tensiunea cîmpului electric, exprimată în V/cm (tensiunea aplicată se împarte la lungimea suportului).

Rezistenţa se corelează cu intensitatea şi tensiunea curentului prin relaţia (6.2).Deci,viteza de migrare va fi invers proporţională cu rezistenţa, care la rîndul ei depinde de tipul şi dimensiunile suportului pentru electroforeză şi concentraţia tamponului folosit.In timpul electroforezei se degajă căldură,cînd rezistenţa se micşorează.La o tensiune constantă,încălzirea conduce la creşterea puterii curentului şi intensificarea evaporării solventului.Pentru a se asigura reproductibilitatea maximă a rezultatelor, se utilizează surse stabilizate de curent, care automat menţin la nivel constant fie tensiunea, fie intensitatea curentului,schimbarea rezistenţei la variaţia temperaturii fiind neglijabilă.Evaporarea soluţiei tampon se reduce la minimum,prevăzînd aparatul de electroforeză cu sistem de răcire.

4.Soluţia tampon crează şi menţine pH-ul suportului.In funcţie de pH-ul mediului de electrolit se modifică ionizarea substanţelor organice şi, prin urmare,mobilitatea lor electroforetică.Astfel, direcţia de migrare a combinaţiilor amfotere (posedînd atît proprietăţi acide cît şi bazice),denumite <u>amfoliţi</u>, depinde de pH-ul mediului de electrolit,iar pentru separarea lor se pot utiliza soluţii tampon cu un diapazon de pH de la 1 la 11.

Capacitatea de tamponare a sistemului tampon condiţionează posibilitatea lui mai mare sau mai mică de a neutraliza produşii electrolizei, formaţi în procesul de electroforeză.Insă creşterea capacităţii de tamponare este direct proporţională cu concentraţia soluţiei.Cu cît este mai mare această concentraţie, cu cît mai mulţi ioni ai substanţei tampon se găsesc în soluţie, cu atît mai mare va fi conductibilitatea soluţiei şi, deci ,încălzirea ei ca urmare a ridicării puterii curentului ce străbate soluţia.De aceea, pe lîngă valoarea pH-ului şi capacitatea de tamponare, o caracteristică importantă a sistemelor tampon, folosite pentru electroforeză, o constituie <u>forţa ionică</u> care reprezintă semi-

suma produsului dintre concentraţie, exprimată în moli, a fiecăruia din ionii aflaţi în soluţie şi pătratul valenţei ionului dat:

$$\mu = \frac{1}{2}\sum_{1}^{n} C_i Z_i^2 , \qquad (6.3)$$

unde : C_i-concentraţia fiecărui tip de ion, exprimată în moli/l ;
Z_i-valenţa fiecărui tip de ioni în soluţie ;
n-numărul ionilor.

Prin creşterea forţei ionice a tamponului, conductibilitatea electrică a acestuia se măreşte, iar viteza de migrare a ionilor probei de analizat scade, ceea ce se reflectă favorabil asupra separării lor. De obicei forţele ionice ale tampoanelor folosite se situează în intervalul de concentraţii 0,03-0,10 M.

Pentru electroforeză cel mai frecvent se folosesc soluţiile tampon acetat, citrat, veronal-medinal, fosfat, tris, EDTA etc. Pentru separarea glucidelor adesea se întrebuinţează tamponul borat care are avantajul că formează cu substanţele respective complecşi încărcaţi electric.

5.Proprietăţile şi compoziţia suportului folosit în electroforeză pot influenţa mobilitatea diferitelor substanţe, datorită adsorbţiei, electroosmozei, temperaturii etc.

Adsorbţia moleculelor probei de către suport s-a constatat în majoritatea cazurilor de separare electroforetică, de unde formarea unor zone care prezintă coadă. Efectul de adsorbţie conduce la micşorarea gradului de separare şi vitezei de migrare. Cea mai mare capacitate de adsorbţie posedă hîrtia.

Electroosmoza (electroendoosmoza) exercită o influenţă însemnată asupra procesului de electroforeză. Fenomenul de adsorbţie este condiţionat de apariţia unei sarcini relative între suprafaţa suportului (de exemplu, filtrele de hîrtie) şi lichidul care-l străbate. Ionizarea grupărilor suportului şi adsorbţia superficială a ionilor tamponului de obicei conduce la transformarea moleculelor de apă în ioni de hidroniu (H_3O^+). Întrucît aceşti ioni sînt încărcaţi pozitiv, ei se mişcă spre catod, antrenînd substanţele neutre solubile şi accelerînd migrarea cationilor ; viteza de deplasare a anionilor scade în acest caz.

Electroosmoza este mai puţin pronunţată în suporturi de tipul acetatului de celuloză sau gelului de poliacrilamidă, decît

în gel de amidon sau hîrtie.

In calitate de suport electroforetic se folosește hîrtia cromatografică, acetatul de celuloză, pulberea de sticlă,celuloză, oxid de aluminiu și oxid de siliciu, gelul de agaroză, amidon și poliacrilamidă.Suporturile se îmbibă cu soluție tampon corespunzătoare condițiilor concrete de lucru.Alegerea suportului pentru migrare depinde de natura substanțelor din proba analizată.Particularitatea comună pentru toate tipurile de suport constă în aceea că substanțele supuse separării migrează în zone distincte, care apoi pot fi ușor evidențiate prin metode analitice corespunzătoare.

Determinarea mobilității electroforetice reale în electroforeză pe mediu poros este o operațiune dificilă.De obicei, în practică se utilizează mărimi relative care caracterizează această mobilitate, mărimi măsurate prin raportul dintre distanța străbătută de fracțiunea dată și distanța parcursă de una din fracțiunile cu viteză mare de migrare, de exemplu albumina,luată ca unitate.

6.2.Clasificarea metodelor electroforetice

Metodele de electromigrare se clasifică în :

-ionoforeza -migrarea ionilor mici într-un cîmp electric ;

-electroforeza- migrarea moleculelor mari (în suspensie sau coloidale) într-un cîmp electric;după încărcarea negativă sau pozitivă a particulelor se deosebește anaforeza și cataforeza ;

-electrodializa -îndepărtarea ionilor mici de moleculele și particulele mari.

Electroforeza se subdivide în electroforeză în coloană de lichid sau electroforeză liberă și electroforeză în care migrarea se face într-un mediu poros, denumită electroforeză zonală (de zonă).

După tensiunea aplicată în electroforeză, aceasta se împarte în electroforeză la tensiune mică și electroforeză la tensiune mare.

Din punct de vedere al tehnicii utilizate, electroforeza se clasifică în electroforeză orizontală și electroforeză verticală.

6.3. Electroforeza pe hîrtie

6.3.1. Principiul metodei

O bandă de hîrtie de filtru îmbibată cu soluţie tampon este întinsă într-un spaţiu închis. Proba de analizat este aplicată pe banda de hîrtie sub formă de picătură sau dungă. Sub influenţa tensiunii curentului electric aplicat la capetele benzii, componentele probei se deplasează şi se separă în fracţiuni.

Revelarea se face înmuind banda într-o baie de colorant potrivit. După spălarea excesului de colorant fracţiunile respective rămîn sub formă de spoturi colorate. Evaluarea fracţiunilor se face fie direct, fie decupînd spoturile şi supunînd lichidul de eluţie colorimetrării.

6.3.2. Aparatură. Aparatura necesară pentru electroforeza pe hîrtie cuprinde în principal două părţi : sursa de curent şi blocul de electroforeză propriu-zis.

Sursa de curent produce un curent continuu, printr-o redresare a curentului alternativ de la reţea şi stabilizarea lui. In general, pentru electroforeza pe hîrtie se folosesc redresoare care debitează un curent continuu de o tensiune pînă la 1000 v şi o intensitate maximă de 150 miliamperi (mA), care asigură fie o tensiune constantă, fie o intensitate constantă, fie ambele. Pentru a se putea citi şi ajusta precis curentul folosit, redresorul trebuie să aibă instrumente sensibile de control a tensiunii (voltmetru) şi intensităţii (miliampermetru).

In blocul de electroforeză intră electrozii, compartimentele pentru soluţia tampon, cadrul de fixare a hîrtiei şi capacul pentru etanşare. Se pot utiliza electrozi din cărbune sau oţel inoxidabil, însă sînt preferaţi cei din platină. Ambele compartimente pentru soluţia tampon sînt împărţite în două secţiuni : camera electrodului şi camera pentru fitilul-punte. La aparatele moderne lipseşte fitilul-punte, capetele hîrtiei fiind imersate în cele două camere cu soluţie tampon, care se află la baza vasului de electroforeză. Contactul electric între soluţiile tampon din camerele fiecărui compartiment se realizează prin nişte orificii sau fante mici în peretele despărţitor dintre camere, sau cu ajutorul unor fitile poroase. Legătura între hîrtie, totdeauna îmbibată cu

tampon pînă la începerea electroforezei,şi soluţia tampon din compartimentele anodic şi catodic de obicei se realizează fie printr-un fitil-punte din hîrtie de filtru, fie prin imersarea directă a hîrtiei în soluţia tampon.

6.3.3.Materialul necesar.Pentru electroforeză se întrebuinţează hîrtia cromatografică obişnuită.Dintre sorturile de hîrtie folosite în acest scop, se menţionează :

-hîrtia de filtru Whatmann(Anglia),nr.1,2,3,3MM sau 4 ;

-hîrtia de filtru Schleicher şi Schül nr.2024, nr.2043 a şi b.

Hîrtia trebuie păstrată la un loc uscat,evitîndu-se praful, umezeala ,şi vaporii sau gazele din atmosfera laboratorului.

La manipularea hîrtiei este recomandabil a se evita atingerea prea frecventă, deoarece grăsimea de pe mîini poate produce inegalitate în adsorbţia şi migrarea probei.

Soluţia tampon are rolul de a menţine umedă hîrtia, conducînd astfel curentul prin ea, şi de a păstra acelaşi pH în timpul electroforezei,astfel ca substanţele să migreze în aceleaşi condiţii constante.

In cazul refolosirii aceleaşi soluţii tampon,se schimbă direcţia curentului electric prin inversarea polilor, în scopul înlăturării modificărilor de pH ale soluţiei tampon în care se află imersaţi electrozii.

Nivelul soluţiei tampon din cele patru camere menţionate trebuie să fie acelaşi pentru a nu se produce sifonarea lichidului. Egalarea nivelului soluţiei între compartimentele anodic şi catodic se realizează prin intermediul unui sifon de sticlă.

Pentru electroforeza pe hîrtie se folosesc în general următoarele soluţii tampon :

A.Soluţie tampon cu pH 8,6 şi forţa ionică 0,05 : 10,3 g medinal (barbital de sodiu) + 1,84 g veronal (barbital sau acid dietilbarbituric) în 1000 ml apă distilată ;

B.Soluţie tampon cu pH 8,6 şi forţa ionică 0,075 : 15,45 g medinal + 2,76 g veronal în 1000 ml apă distilată ;

C.Soluţie tampon cu pH 8,6 şi forţa ionică 0,1 : 29,43 g medinal + 19,42 g acetat de sodiu hidratat sau 11,71 g acetat de sodiu anhidru se dizolvă în 1000 ml apă distilată, apoi se adaugă 180 ml soluţie de HCl 0,1 N şi se completează volumul cu apă dis-

tilată la 3000 ml ;

D.Soluţie tampon 0,108 M,cu pH 8,6 : 40,1 g veronal + 81 ml soluţie NaOH 2N şi apă distilată pînă la 2000 ml.

Pentru conservarea soluţiei tampon se poate adăuga un cristal de timol.

6.3.4.Procedeul general de separare electroforetică.După alegerea sortului adecvat de hîrtie pentru electroforeză,urmează tăierea hîrtiei şi notarea liniei de start după tehnica şi dimensiunile aparatului de electroforeză respectiv.Fîşiile de hîrtie astfel pregătite se umectează prin imersarea lor în soluţie tampon şi după îndepărtarea excesului de soluţie tampon prin presare între două hîrtii de filtru, se aşază în vasul de electroforeză cu capetele imersate în camerele cu soluţie tampon.După aşezarea fîşiilor sau benzilor de hîrtie cît mai întinse în aparatul de electroforeză,se aplică proba de analizat,cu ajutorul unei micropipete,sub formă de punct sau dungă de-a lungul liniei de start.Se conectează imediat curentul electric de puterea dorită.Aparatul de electroforeză ca şi benzile de hîrtie trebuie să stea perfect orizontal.

După durata de separare necesară,hîrtiile se scot din aparatul de electroforeză,se usucă şi apoi urmează punerea în evidenţă a zonelor separate şi evaluarea cantitativă a electroforegramelor.

Metoda cea mai larg practicată de determinare a poziţiei substanţelor după electroforeza pe hîrtie,de asemenea pe acetat de celuloză şi în gel,constă în tratamentul suportului cu un colorant adecvat care colorează selectiv componentele probei.Dacă colorantul interacţionează calitativ cu componentele amestecului, atunci se poate determina cantitatea substanţei colorate prin unul din următoarele două procedee.In primul rînd,se poate decupa porţiunea de suport corespunzătoare spotului colorat şi se extrage combinaţia colorată cu un solvent potrivit,apoi se determină cantitatea ei prin fotocolorimetrie sau spectrofotometrie. După al doilea procedeu electroforegrama colorată se evaluează prin fotometrare directă cu ajutorul unor fotometre construite în acest scop.

6.3.5. Aplicaţii ale electroforezei

Electroforeza se utilizează pentru separarea moleculelor purtînd sarcini electrice. Electroforeza pe hîrtie a găsit o largă utilizare pentru separarea aminoacizilor, peptidelor, proteinelor, nucleotidelor, acizilor nucleici şi derivaţilor încărcaţi electric ai glucidelor. Această metodă se foloseşte cu mare frecvenţă în laboratoarele clinice şi în laboratoarele de cercetare pentru separarea proteinelor, glicoproteinelor şi lipoproteinelor din serul sanguin.

Bibliografie : 17,23,31,50

7.NOTIUNI PRACTICE DE ENZIMOLOGIE

7.1.Principii generale privind determinarea activității enzimelor.

Enzimele sau fermenții îndeplinesc funcția importantă de catalizatori biologici ai reacțiilor biochimice în organismul viu. Diferite enzime intră în compoziția tuturor celulelor vii atît animale cît și vegetale.

Din punct de vedere structural toate enzimele sînt substanțe proteice.Ele se clasifică de obicei în enzime monocomponente și enzime bicomponente.

Enzimele monocomponente reprezintă proteine simple de tipul albuminelor și globulinelor, a căror molecule conțin numai aminoacizi.In realizarea acțiunii catalitice a enzimelor au rol numai unii aminoacizi din molecula proteică,anume cei care intră în structura așa-numitului centru activ al enzimei date.

Enzimele bicomponente aparțin proteinelor complexe.Molecula acestor enzime este constituită dintr-o componentă proteică,numită apoenzimă(apoferment) și o grupare prostetică.Grupările prostetice ale unor enzime se separă ușor de apoenzimă și se numesc coenzime (cofermenți).Acestea formează centrul activ al enzimelor respective.

Studiul structurii chimice ,proprietăților cinetice și mecanismului de acțiune a enzimelor constituie obiectul enzimologiei, una din direcțiile cele mai rapide de dezvoltare a problemelor biochimiei contemporane.

Orice lucrare de enzimologie trebuie să înceapă cu însușirea metodelor de determinare a activității enzimei date și stabilirea condițiilor care asigură viteza maximă de reacție.

Spre deosebire de majoritatea celorlalți compuși biochimici, cantitatea unei enzime nu poate fi măsurată,cu unele excepții,în valori absolute,adică în mg sau moli de enzimă.

Cantitatea unei enzime se estimează indirect după activitatea ei,cu alte cuvinte în funcție de viteza reacției catalizată de acea enzimă.

Activitatea enzimelor se poate aprecia fie după viteza de

acumulare a produşilor reacţiei enzimatice date,fie după viteza de epuizare (diminuare) a substratului în condiţii optime de temperatură,pH,concentraţie a substratului şi cofactorilor,pentru o perioadă determinată de timp.

Se recomandă ca activitatea enzimelor,pe cît posibil,să se determine după viteza iniţială de reacţie,deci în calcule se vor lua în considerare datele obţinute pentru intervalul iniţial de timp,cînd viteza de reacţie nu depinde de timpul de incubaţie. Cu alte cuvinte,cînd,de exemplu,pentru fiecare minut se scindează una şi aceeaşi cantitate de substrat.In acest timp există un exces de substrat şi produşii de reacţie s-au format în cantitate mică.Este de dorit ca determinarea vitezei de reacţie să se efectueze în astfel de condiţii,încît cantitatea substratului transformat să nu depăşească 20 % din cea iniţială(V.L.Kretovici, 1967).

Pentru determinarea activităţii enzimelor se pot utiliza, în funcţie de tipul reacţiei catalizate ,metode colorimetrice, spectrofotometrice,fluorimetrice,manometrice,conductimetrice, vîscozimetrice,cromatografice,electroforetice etc.In laboratoarele de cercetare sau producţie cu profil biochimic se folosesc cel mai adesea metodele colorimetrice şi spectrofotometrice.

Metodele colorimetrice se bazează pe măsurarea cu ajutorul fotoelectrocolorimetrului a intensităţii culorii substanţei care se formează prin interacţiunea substratului sau produsului de acţiune a enzimei cu un reactiv specific,care se adaugă în probă după oprirea reacţiei enzimatice.

La baza metodelor spectrofotometrice se află absorbţia luminii în domenii determinate ale spectrului,de către substratele sau produşii reacţiei,mai rar de către coenzimele enzimelor bicomponente.Spectrele acestor combinaţii pot avea maximele de absorbţie la o lungime de undă determinată atît în domeniul ultraviolet cît şi în cel vizibil.

Pentru eliminarea factorilor de eroare,la determinarea activităţii unei enzime se impune să se efectueze pe lîngă proba propriu-zisă(proba de cercetat sau proba cu enzima activă) şi un control, în care enzima se inactivează prin fierbere,prin adăugare de acizi sau baze tari etc.Acest control este necesar întrucît

într-o serie de cazuri pot să se producă modificări spontane ale substratului,necorelate direct cu acţiunea catalitică a enzimei studiate sau sursa de enzimă poate să conţină compuşi chimici identici sau asemănători structural cu produşii reacţiei date.

Exprimarea activităţii uneia şi aceleiaşi enzime se face în unităţi convenţionale,care se stabilesc arbitrar şi sînt foarte diverse de la un autor la alt autor.Aceasta îngreuiază compararea rezultatelor obţinute în diferite laboratoare.In plus,lipsa unor unităţi standard nu oferă posibilitatea confruntării rezultatelor.

Pentru evitarea situaţiei menţionate,Comisia de Enzimologie a Uniunii Internaţionale de Biochimie a propus să se ia ca unitate a unei enzime acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea unui micromol de substrat sau formarea unui micromol de produs de reacţie în timp de un minut,în condiţii date.In acest caz este obligatoriu să se indice temperatura la care s-a desfăşurat reacţia enzimatică.Celelalte condiţii pH-ul,concentraţia substratului şi altele trebuie să fie optime.

Plecînd de la recomandările Comisiei de Enzimologie,activitatea enzimelor în soluţie sau în lichidele biologice(de exemplu : serul sanguin,lichidul separat după cultivarea microorganismelor pe diferite medii etc.) se va exprima în unităţi la 1 ml într-un minut,iar activitatea enzimelor din ţesuturile animale sau vegetale şi din biomasa produsă de microorganisme,se va reda în unităţi pe un gram de ţesut sau biomasă într-un minut.Adesea,activitatea enzimelor se exprimă în micromoli de substrat tranformat sau de produs format pe ml(gram) în timp de o oră.

Dacă în preparatul enzimatic sau materialul biologic studiat se poate determina cantitatea de proteină,atunci pentru creşterea gradului de semnificaţie a rezultatelor se recomandă să se calculeze <u>activitatea specifică</u> a enzimei date,care reprezintă numărul unităţilor enzimatice raportate la un mg de proteină.

7.2.<u>Factorii care influenţează viteza unei reacţii enzimatice</u>

Viteza unei reacţii enzimatice se modifică în funcţie de concentraţia enzimei,concentraţia substratului,temperatură,pH-ul

mediului şi natura soluţiei tampon etc.

7.2.1. Influenţa concentraţiei enzimei asupra vitezei reacţiei enzimatice

Viteza reacţiei enzimatice depinde înainte de toate de natura enzimei, care poate fi caracterizată printr-o activitate scăzută sau ridicată. Cînd substratul şi cofactorii se află în exces, viteza inițială a reacţiei enzimatice este proporţională cu concentraţia enzimei :

$$v = k.[E] , \qquad (7.1)$$

unde v -viteza de reacţie;
k -constanta vitezei de reacţie şi
[E]-concentraţia enzimei.

Prin reprezentarea grafică a dependenţei între concentraţia enzimei şi viteza de reacţie se obţine o linie dreaptă, dacă pe axa absciselor se trece concentraţia enzimei, iar pe axa ordonatelor, valoarea vitezei iniţiale de reacţie.

Obţinerea experimentală a acestei dependenţe pentru orice enzimă nu prezintă dificultăţi.

7.2.2. Influenţa concentraţiei substratului asupra vitezei reacţiei enzimatice

Dependenţa vitezei iniţiale a reacţiei enzimatice de concentraţia substratului aproape totdeauna se exprimă grafic sub forma unei curbe cu aspect hiperbolic (fig.7.1).

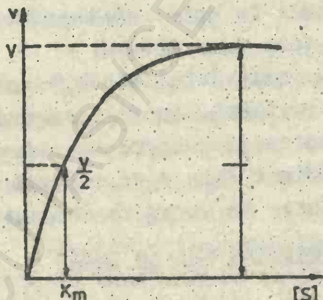
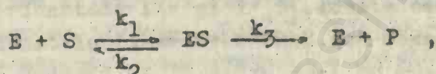


Fig.7.1. Dependenţa între viteza reacţiei enzimatice şi concentraţia substratului

Dacă în sistemul de reacţie se află o cantitate mică de substrat, atunci se observă o dependenţă netă între concentraţia lui şi viteza de reacţie. In cazul concentraţiilor mari de substrat, această dependenţă nu se menţine. Viteza invariabilă care se înregistrează la un exces de substrat, ce asigură saturarea enzimei, se numeşte <u>viteză</u> <u>maximă</u> a reacţiei enzimatice(v).

Ecuaţia vitezei reacţiei enzimatice a fost propusă pentru prima dată de L.Michaelis şi M.L.Menten(1913). Ei au plecat de la presupunerea că enzima E şi substratul S interacţionează, formînd complexul enzimă-substrat ES, care apoi se scindează în enzima liberă şi produsul de reacţie P. Aceasta schematic se poate reprezenta prin ecuaţia :



$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P ,$$

unde : k_1-constanta vitezei de reacţie de formare a complexului intermediar enzimă-substrat ES ;

k_2-constanta vitezei de reacţie inversă de disociere a complexului enzimă-substrat în substanţele iniţiale ;

k_3-constanta vitezei de reacţie, de scindare a complexului enzimă-substrat în enzima liberă şi produsul de reacţie.

Notînd concentraţia totală a enzimei cu $[E]$, concentraţia substratului liber cu $[S]$ şi concentraţia complexului enzimă-substrat cu $[ES]$, concentraţia enzimei libere va fi egală cu $[E]-[ES]$. Schimbarea concentraţiei substratului poate să nu fie luată în consideraţie, întrucît pentru condiţiile iniţiale $S \gg E$ şi cantitatea de substrat transformat este foarte mică.

Dacă se aplică legea acţiunii maselor la reacţia de formare a complexului ES, se găseşte că :

$$v_1 = k_1([E]-[ES])[S] \qquad (7.2)$$

Complexul ES poate să disocieze, pe calea reacţiei inverse, în E şi S, sau poate să se descompună în produsul P şi E. Viteza de scindare a complexului ES va fi egală cu suma vitezelor acestor două reacţii :

$$-v_2 = k_2[ES] + k_3[ES] = (k_2+k_3)[ES] \qquad (7.3)$$

La echilibru v_1 va fi egală cu v_2 şi prin urmare :

$$k_1([E] - [ES])[S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

Rearanjînd această ecuaţie,se obţine :

$$\frac{([E]-[ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \qquad (7.4)$$

Constanta K_m se numeşte <u>constanta lui Michaelis-Menten</u>.

După cum se vede ,viteza reacţiei enzimatice este proporţională cu concentraţia $[ES]$.La o concentraţie mare a substratului, enzima va fi complet saturată cu acesta şi concentraţia complexului enzimă-substrat $[ES]$ va deveni egală cu concentraţia totală a enzimei $[E]$.In acest caz se atinge viteza maximă de reacţie. Notînd viteza maximă cu V,se poate scrie ecuaţia :

$$V = K.[E] \qquad (7.5)$$

Pe baza aceloraşi consideraţii,orice viteză a reacţiei enzimatice va fi :

$$v = K[ES] \qquad (7.6)$$

Dacă în ecuaţia (7.4) care determină constanta K_m se substituie mărimile $[E]$ şi $[ES]$ cu valorile ce rezultă din ultimile două ecuaţii ($[E] = \frac{V}{K}$ şi $[ES] = \frac{v}{K}$),rezultă :

$$K_m = [S]\left(\frac{V}{v} - 1\right) \qquad (7.7)$$

In această ecuaţie se pot măsura toate mărimile şi astfel se poate determina constanta Michaelis-Menten experimental.Mărimea K_m după această ecuaţie are o valoare exactă,concretă.Ea indică acea concentraţie a substratului pentru care viteza reacţiei enzimatice este egală cu jumătatea vitezei maxime posibile($v = \frac{V}{2}$). In acest caz expresia din paranteză reprezintă unitatea ($\frac{V}{V/2} - 1 = 2 - 1 = 1$).Prin urmare,$K_m$ este egală cu concentraţia molară a substratului la care jumătate din enzimă se găseşte legată cu substratul,iar cealaltă jumătate se află în stare liberă. Deoarece concentraţia enzimei este foarte mică în comparaţie cu concentraţia substratului,constanta K_m nu depinde de concentraţia enzimei.

Constanta K_m se poate determina experimental prin trasarea

curbei de viteză în funcţie de concentraţia substratului.Pentru construirea graficului se determină viteza de reacţie v la diferite valori ale concentraţiei substratului.Trecînd pe axa absciselor concentraţia substratului,iar pe axa ordonatelor,viteza de reacţie se obţine graficul din fig.7.1.Dacă pe acest grafic se notează viteza de reacţie egală cu jumătatea vitezei maxime, atunci fragmentul corespunzător pe axa absciselor va reprezenta constanta K_m.Dar valoarea K_m determinată în acest mod nu se caracterizează prin exactitate.

Un procedeu mai răspîndit de determinare a parametrilor cinetici ai ecuaţiei (7.7) se bazează pe reprezentarea datelor experimentale în coordonatele 1/v şi 1/[S].Aceste coordonate poartă numele de coordonatele Lineweaver-Burk.Cum rezultă din ecuaţia :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} , \qquad (7.8)$$

graficul dependenţei (7.7) în coordonatele Lineweaver-Burk are aspectul unei drepte care întretaie axa absciselor şi ordonatelor în punctele $1/K_m$ şi respectiv $1/V$ (fig.7.2).Tangenta unghiului de pantă a dreptei este egală cu $\frac{K_m}{V}$.

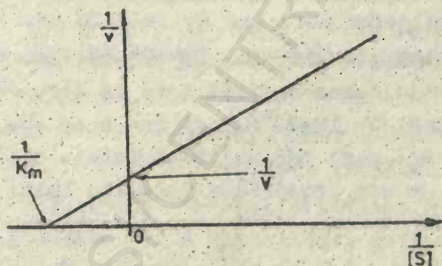


Fig.7.2.Determinarea vitezei maxima şi constanţei Michaelis-Menten prin metoda Lineweaver-Burk

Pe o astfel de dreaptă se pot determina valorile mai uşor şi cu o mai mare precizie,întrucît coincidenţa datelor experimentale sau abaterilor lor de la liniaritate se descoperă mai simplu decît în cazul reprezentării grafice precedente (fig.7.1)

Valorile constantei K_m pentru diferite enzime sînt foarte diferite.O constantă mare indică,că legătura între enzimă şi substrat este slabă.Cu cît K_m are o valoare mai mică,cu atît legă-

tura între E și S se distinge printr-o stabilitate mai ridicată, cu atît mai crescută este afinitatea între ele. Enzima cu o constantă K_m mică va manifesta în organismul viu o activitate mare. Cu ajutorul constantei K_m se poate obține experimental, o caracteristică cantitativă importantă a enzimei.

7.2.3. Efectul temperaturii asupra vitezei reacției enzimatice

Viteza reacțiilor enzimatice depinde de temperatură. Prin ridicarea temperaturii pînă la o valoare determinată viteza reacției enzimatice, la fel ca și a majorității proceselor chimice, crește. Spre deosebire de reacțiile neenzimatice, creșterea vitezei de reacție în cazul enzimelor se observă într-un interval restrîns de temperatură. Pentru fiecare enzimă există o temperatură caracteristică la care viteza de reacție atinge valoarea maximă. Temperatura corespunzătoare vitezei maxime, se numește temperatura optimă a enzimei luată în studiu. La temperaturi mai înalte decît cea optimă, enzimele se denaturează (se inactivează) și își pierd activitatea catalitică.

Efectul temperaturii asupra activității enzimelor se exprimă prin așa-numitul coeficient de temperatură Q_{10}, care arată de cîte ori crește viteza de reacție dacă temperatura se mărește cu $10^{\circ}C$ într-un domeniu în care nu are loc denaturarea termică a enzimei respective. Coeficienții de temperatură ai reacțiilor enzimatice au valori cuprinse între 1 și 2.

Pentru studierea influenței temperaturii asupra vitezei reacției enzimatice, se determină activitatea enzimei date la diferite temperaturi, situate între limitele $10-80^{\circ}C$, după cum acea enzimă prezintă o termostabilitate mai mare sau mai mică. Datele obținute se exprimă grafic, trecînd pe axa absciselor valorile luate pentru temperatură, iar pe axa ordonatelor activitatea enzimei în unități standard.

7.2.4. Efectul pH-ului mediului și naturii soluției tampon asupra vitezei reacției enzimatice

Viteza reacțiilor enzimatice este influențată puternic de pH-ul mediului. Activitatea maximă a enzimelor se manifestă într-un interval îngust de pH, care se numește pH-ul optim de acțiune

al enzimei date. Atît scăderea cît şi creşterea pH-ului de la valoarea optimă conduce la diminuarea activităţii enzimelor. Majoritatea enzimelor au pH-ul optim localizat în domeniul neutru.

Efectul pH-ului asupra vitezei reacţiei enzimatice se poate explica prin modificarea stabilităţii enzimei şi gradului de ionizare a grupărilor ei funcţionale, de asemenea, a substratului şi cofactorilor.

Menţinerea valorii pH-ului optim în mediul de reacţie la determinarea activităţii unei enzime este una din condiţiile importante ce se cer îndeplinite. Asupra dependenţei între activitatea enzimatică şi pH, o influenţă esenţială poate să exercite forţa ionică şi compoziţia soluţiei tampon. Trebuie aleasă o asemenea soluţie tampon care să nu inhibe activitatea enzimei studiate şi să asigure menţinerea pH-ului mediului de incubaţie apropiat de valoarea optimă a enzimei respective.

De aceea pe cale experimentală se stabileşte pH-ul optim şi compoziţia corespunzătoare a soluţiei tampon pentru fiecare enzimă.

Această sarcină constă în măsurarea vitezei reacţiei enzimatice, utilizîndu-se soluţii tampon cu valori cunoscute ale pH-ului.

Valorile activităţii enzimei obţinute la diferite valori ale pH-ului se înscriu pe axa ordonatelor, iar valorile corespunzătoare ale pH-ului pe axa abscisalor. Se obţine o curbă caracteristică ce exprimă dependenţa vitezei reacţiei enzimatice de pH-ul mediului.

7.2.5. Influenţa timpului de incubaţie asupra vitezei reacţiei enzimatice

Pentru a avea posibilitatea comparării activităţii diferitelor enzime sau a activităţii unei enzime în anumite condiţii, se măsoară viteza reacţiei enzimatice, adică cantitatea de substrat transformat sau cantitatea de produs format într-un interval determinat de timp. Datele obţinute se reprezintă grafic, notîndu-se pe axa ordonatelor cantitatea de substrat transformat sau de produs de reacţie format, iar pe axa abscisalor timpul de măsurare (incubaţie). In acest caz se obţin curbe care au un aspect asemănător cu cel al graficului din fig.7.3.

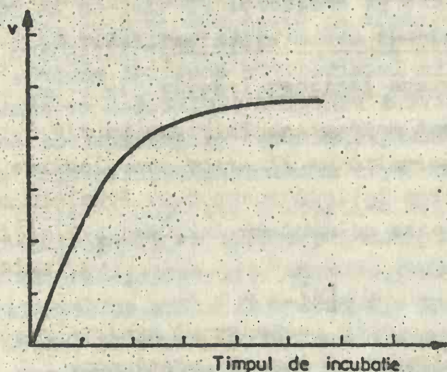


Fig.7.3.Reprezentarea grafică a mersului unei reacţii enzimatice

Din fig.7.3. se observă că viteza reacţiei enzimatice la începutul perioadei de incubaţie este mai mult sau mai puţin constantă,după care se diminuează treptat.Scăderea vitezei reacţiei enzimatice poate fi cauzată de următorii factori :

1).Pe măsură ce substratul se consumă,concentraţia lui în sistemul de reacţie se micşorează,ceea ce conduce la diminuarea gradului de saturare a enzimei cu substrat.

2).In cazul unei reacţii reversibile,produşii ce rezultă pot influenţa echilibrul ei,deoarece după legea acţiunii maselor viteza reacţiilor reversibile este proporţională cu concentraţia substanţelor care reacţionează.

3).Produşii de reacţie pot inhiba în mod specific activitatea enzimelor.

4).Modificarea condiţiilor din sistem,de exemplu,acidifierea în urma apariţiei unor produşi cu caracter acid.

5).Inactivarea parţială a enzimelor în timpul incubaţiei.Intrucît unele enzime din anumite obiecte biologice au o activitate relativ mică,timpul de incubaţie se prelungeşte de la cîteva ore pînă la 24 ore.De reţinut că incubaţia prelungită poate fi asociată cu inactivarea enzimei sub acţiunea temperaturii şi infectarea microbiană a mediului de reacţie.De aceea ,în cazul prelungirii timpului de incubaţie se adaugă la amestecul de reacţie substanţe antiseptice(toluen,cloroform,timol etc.) care nu influenţează activitatea enzimei cercetate.

Se recomandă ca timpul de incubaţie să se reducă la minimum pentru a exclude efectul nefavorabil al factorilor indicaţi mai sus.

<u>Bibliografie</u> :2,10,18,19,48

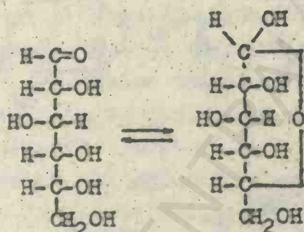
8. MONOGLUCIDE, OLIGOGLUCIDE SI POLIGLUCIDE

METABOLISMUL LOR

Glucidele,numite şi zaharide sau carbohidraţi,constituie din punct de vedere cantitativ ,cea mai importantă clasă de substanţe organice naturale.Ele sînt foarte răspîndite în plante (pînă la 80-90 % din substanţa uscată a organelor şi ţesuturilor vegetale).Conţinutul glucidelor în microorganisme atinge 30 % din substanţa uscată a acestora.In organismele animale glucidele se găsesc în cantitate mai redusă.

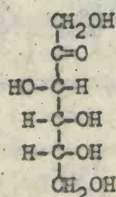
După structura chimică,glucidele se împart în trei clase mari :monoglucide,oligoglucide şi poliglucide.

Monoglucidele(monozaharidele sau ozele) reprezintă combinaţii polihidroxicarbonilice cu lanţul C-C neîntrerupt.După natura grupei carbonilice din compoziţia lor,se disting polihidroxialdehide sau aldoze care conţin grupa aldehidică (H—C=O) şi polihidroxicetone sau cetoze,în care este prezentă grupa cetonică (>C=O). Aldozele şi cetozele există atît în forma carbonilică sau deschisă cît şi în forma semiacetalică sau ciclică,ambele forme fiind capabile să se transforme una în cealaltă :

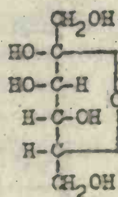


Forma carbonilică   Forma semiacetalică

D-Glucoza



Forma deschisă



Forma ciclică

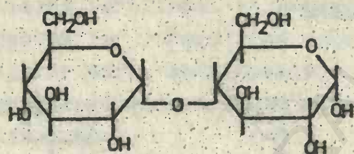
D-Fructoza

Datorită structurii lor specifice,monoglucidele manifestă unele proprietăţi caracteristice care,aşa cum se va vedea mai

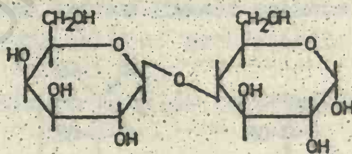
departe,se află la baza metodelor de determinare cantitativă a acestor substanţe.

Oligoglucidele (oligozaharidele sau oligozidele) şi poliglucidele(polizaharidele sau poliozidele) sînt produşi de condensare ai monoglucidelor şi au moleculele alcătuite din resturi monoglucidice unite între ele prin legături O-glicozidice.

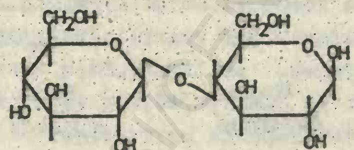
Se consideră,că oligoglucidele conţin pînă la 8-lo resturi de monoglucide.In dependenţă de numărul resturilor de monoglucide se deosebesc diglucide,triglucide,tetraglucide etc.La unul din capetele catenei oligoglucidelor,în care legăturile glicozidice se formează între hidroxilul semiacetalic al unei monoglucide şi un hidroxil alcoolic al altei monoglucide,rămîne un hidroxil glicozidic nesubstituit.Astfel de oligoglucide,care posedă capacitatea de a da unele din reacţiile combinaţiilor carbonilice,se numesc oligoglucide reducătoare.Ca exemple de oligoglucide reducătoare se menţionează maltoza(I),lactoza(II),celobioza(III) etc.



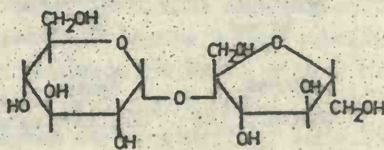
I



II



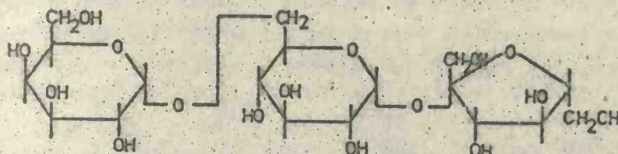
III



IV

In alte oligoglucide legătura glicozidică se realizează cu participarea tuturor hidroxililor semiacetalici ai resturilor monoglucidice.Aceste oligoglucide nu manifestă proprietăţi caracteristice aldehidelor şi de aceea se numesc oligoglucide nereducătoare. Reprezentanţii tipici ai oligoglucidelor nereducătoare sînt zaharoza(IV),rafinoza(V) etc.

Cea mai caracteristică reacţie pentru toate oligoglucidele



V

este hidroliza acidă, în urma căreia are loc scindarea legăturilor glicozidice şi eliberarea monoglucidelor componente.

Oligoglucidele se întîlnesc atît în regnul vegetal(zaharoza, rafinoza, maltoza) cît şi în regnul animal(lactoza).

Poliglucidele conţin în molecula lor sute şi chiar mii de resturi monoglucidice. Aceste substanţe sînt prezente în plante (amidon, celuloză, inulină, fleină) şi în organismele animale(glicogen, chitină, poliglucidele ţesutului conjunctiv etc.).

8.1. DOZAREA GLUCIDELOR SOLUBILE

Masa principală a glucidelor în majoritatea plantelor o constituie amidonul şi celuloza. Pe lîngă poliglucide, în organismele vegetale se găsesc cartităţi apreciabile de oligoglucide şi monoglucide, ultimile două clase de glucide fiind uşor solubile în apă şi în alcooli inferiori.

Dintre oligoglucide foarte importante sînt diglucidele, de exemplu : zaharoza(IV), maltoza(I) şi altele.

Puterea reducătoare a grupei carbonilice din molecula monoglucidelor şi diglucidelor reducătoare stă la baza metodelor de determinare a acestora în obiectele biologice.

8.1.1. DOZAREA MONOGLUCIDELOR SI OLIGOGLUCIDELOR REDUCATOARE

Principiul metodei. Pentru analiză se foloseşte un amestec format din sulfat de cupru cu tartrat dublu de sodiu şi potasiu (sare Seignette) în mediu alcalin. Prin amestecarea sulfatului de cupru cu carbonatul alcalin are loc reacţia :



$$2CuSO_4 + Na_2CO_3 + 2H_2O \longrightarrow CuCO_3 . Cu(OH)_2 + 2NaHSO_4$$

Tartratul dublu de sodiu şi potasiu prezent în amestec facilitează formarea complexului tartro-cupric solubil,ceea ce împedică apariţia oxidului cupric de culoare neagră :

$$4\begin{array}{c}COOK\\|\\CHOH\\|\\CHOH\\|\\COONa\end{array} + \begin{array}{l}HO-Cu-O\\HO-Cu-O\end{array}\!\!>C=O \longrightarrow 2\begin{array}{c}COOK\\|\\CHO\\|\\CHOH\\|\\COONa\end{array}\!\!\rightarrow Cu \leftarrow\!\!\begin{array}{c}KOOC\\|\\HOHC\\|\\OHC\\|\\NaOOC\end{array} + 3H_2O + CO_2$$

Sare Seignette — Complex tartro-cupric solubil

Monoglucidele şi oligoglucidele reducătoare(cu legătură monocarbonilică) reduc cuprul din complexul tartro-cupric solubil, la cald,cu formarea unui precipitat de oxid cupros de culoare roşie-cărămizie :

$$2\begin{array}{c}COOK\\|\\CHO\\|\\CHOH\\|\\COONa\end{array}\!\!\rightarrow Cu \leftarrow\!\!\begin{array}{c}KOOC\\|\\HOHC\\|\\OHC\\|\\NaOOC\end{array} + \begin{array}{c}H\\|\\C{=}O\\|\\R\end{array} + 2H_2O \longrightarrow 4\begin{array}{c}COOK\\|\\CHOH\\|\\CHOH\\|\\COONa\end{array} + \begin{array}{c}COOH\\|\\R\end{array} + Cu_2O$$

Glucidă reducătoare — Acid carboxilic — Oxid cupros

După cantitatea de Cu_2O format se poate aprecia conţinutul de glucide în proba de analizat.Cantitatea oxidului cupros se determină iodometric.Pentru aceasta oxidul cupros format se dizolvă într-o soluţie de HCl şi apoi se oxidează cu un exces de soluţie titrată de iod.

Prin dizolvarea oxidului cupros în HCl se obţine următorul complex incolor $H[CuCl_2]$,respectiv sarea lui de sodiu,luînd în consideraţie prezenţa Na_2CO_3 în mediul de reacţie :

$$Cu_2O + 4HCl + Na_2CO_3 \longrightarrow 2Na[CuCl_2] + 2H_2O + CO_2$$

Complexul,astfel obţinut,nu este prea stabil şi se descompune în prezenţa iodului după ecuaţia :

$$2Na[CuCl_2] + I_2 \longrightarrow 2CuCl_2 + 2NaI$$

Iodul,care nu a intrat în reacţie este retitrat cu tiosulfat de sodiu,în prezenţa amidonului ca indicator :

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Din volumul de soluţie de iod consumată pentru oxidareaoxidului cupros se poate calcula,ţinînd seama de reacţiile de mai sus, cantitatea de oxid cupros şi apoi conţinutul de glucide reducătoare în proba de analizat.

Reactivi.1.Soluţie de sulfat de cupru cu tartrat de sodiu şi potasiu în mediu alcalin.Pentru prepararea acestui reactiv se dizolvă 5 g sulfat de cupru cristalizat,300 g sare Seignette şi 10g Na_2CO_3 anhidru în 900 ml apă distilată la rece.Apoi,amestecul se încălzeşte timp de 2 ore pe baie de apă la fierbere,se răceşte şi se trece într-un balon cotat de 1000 ml,completînd conţinutul cu apă distilată la semn.

2.Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,0323 N.Se dizolvă 8 g tiosulfat de sodiu în 1000 ml apă distilată,în prealabil fiartă bine pentru a îndepărta CO_2.După trecerea a 2-3 zile,se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat cu ajutorul unei soluţii de dicromat de potasiu N/25.Un ml soluţie de tiosulfat exact 0,0323 N corespunde la 1 mg de glucoză.

3.Soluţie de iod 0,0323 N.Se dizolvă 4,1 g iod şi 20 g IK în 25-50 ml apă distilată.După dizolvarea completă a reactivilor,volumul soluţiei se aduce la 1000 ml cu apă distilată.

4.Soluţie de amidon 1%.Se suspendă 1 g de amidon în 10 ml apă distilată rece,apoi suspensia obţinută se adaugă la 90 ml apă distilată în fierbere.După ce se fierbe timp de 2 minute,soluţia se răceşte şi se completează volumul la 100 ml.Pentru conservare în soluţia de amidon se dizolvă clorură de sodiu pînă la saturare.

5.Soluţie de HCl : 82 ml HCl concentrat(d=1,19) se diluează cu apă distilată pînă la 1000 ml.

6.Soluţie de acetat bazic de plumb : 60 g acetat de plumb se mojarează cu 20 g litargă(PbO).Amestecul se încălzeşte pe baia de apă într-o capsulă de porţelan acoperită cu o sticlă de ceas pînă ce masa capătă o culoare alb-roz.Se adaugă 200 ml de apă distilată fierbinte,trecînd totul într-un balon cotat de 250 ml.După răcire se aduce la semn cu apă distilată şi se lasă în repaus 10-12 ore,apoi se filtrează în flacoane de culoare brună,care se închid ermetic întrucît în contact cu aerul soluţia se tulbură.

7.Soluţie saturată de sulfat de sodiu.

Modul de lucru. Determinarea cuprinde trei operaţii : extragerea glucidelor din produsul respectiv cu ajutorul apei, purificarea extractului vegetal şi dozarea glucidelor reducătoare în extractul defecat.

Prepararea extractului vegetal. O cantitate de 5-25 g(în funcţie de conţinutul presupus de glucide) din materialul vegetal uniform omogenizat se introduce într-un flacon conic cu capacitatea de 150-200 ml. Se adaugă 70-80 ml apă distilată încălzită la 85-90° şi proba se introduce într-o baie de apă pînă la nivelul lichidului din flacon. Se încălzeşte la 75-80°, timp de 60 minute, agitînd cu intermitenţă. Apoi, extractul fierbinte se filtrează prin decantare într-un balon cotat de 100 ml, spălînd cantitativ, de mai multe ori, cu cîte 5-10 ml de apă distilată fierbinte, atît materialul vegetal din flacon, cît şi filtrul.

Defecarea extractului glucidic. In extractul obţinut va exista totdeauna o serie de substanţe reducătoare de altă natură, mai ales proteine, precum şi poliglucide. Pentru acest motiv devine necesară defecarea extractelor glucidice în vederea purificării lor. In acest scop, la filtratul fierbinte din balonul cotat se adaugă soluţie de acetat bazic de plumb(1-3 ml) pînă cînd nu mai are loc nici o precipitare şi se agită energic. Se lasă în repaus pentru sedimentarea precipitatului format. După 10-15 minute se controlează dacă defecarea materialului este completă, adăugîndu-se la extract 2-3 picături de soluţie de acetat bazic de plumb. Dacă soluţia nu devine opalescentă, precipitarea este completă. Conţinutul balonului cotat se răceşte şi se completează la semn cu apă distilată. Apoi se lasă să se depună precipitatul şi se filtrează într-un pahar sau un flacon uscat. O cantitate de 50 ml filtrat se trece într-un balon cotat de 100 ml şi se adaugă 3-5 ml soluţie saturată de sulfat de sodiu pentru îndepărtarea excesului de acetat de plumb. Conţinutul balonului se completează la semn cu apă distilată şi se agită. După depunerea precipitatului, soluţia se filtrează pe hîrtie de filtru cantitativă(pentru precipitate fine) sau se centrifughează. In filtratul obţinut se dozează glucidele reducătoare.

Determinarea glucidelor reducătoare în extractul defecat. Intr-un flacon conic de 300 ml se măsoară cu o pipetă 1-20 ml fil-

trat şi se completează pînă la 25 ml cu apă distilată. Se adaugă 50 ml soluţie de complex tartro-cupric(reactiv 1) şi un vîrf de spatulă de pulbere de talc sau piatră ponce. Conţinutul flaconului se aduce la fierbere pe o sită de azbest. Apoi, se fierbe moderat, la flacără mică, timp de 5 minute(!). După fierbere, flaconul (evitîndu-se agitarea conţinutului) se răceşte în apă de conductă. In flacon se introduc 15 ml soluţie de HCl(reactiv 5) şi imediat (altfel oxidul cupros care trece în soluţie poate să se oxideze cu oxigenul din aer) se adaugă din biuretă 20 ml soluţie de iod 0,0323 N.

Flaconul se închide cu un dop de cauciuc, se agită conţinutul prin rotire şi se lasă în repaus timp de 2 minute. Apoi se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu pînă cînd culoarea amestecului din flacon devine galben închis. Se adaugă cîteva picături de amidon şi se continuă titrarea pînă la dispariţia colorației indicatorului(conţinutul flaconului va avea o tentă bleu pal).

Paralel cu proba de analizat se execută o probă de control, în care extractul glucidic este înlocuit cu un volum echivalent de apă distilată.

Observaţie. După fierbere, soluţia din flacon trebuie să fie colorată în albastru. Dacă culoarea este galbenă, înseamnă că extractul vegetal are o concentraţie prea mare în glucide reducătoare. In acest caz, determinarea se repetă diluîndu-se extractul glucidic defecat.

Calculul rezultatelor. Cantitatea glucidelor reducătoare, exprimată în grame de glucoză, în 100 g material vegetal proaspăt, se calculează după formula :

$$X = \frac{(n_1-n_2).F.100.100.100}{a.v.50.1000} = \frac{(n_1-n_2).F.20}{a.v}, \quad (8.1)$$

unde : n_1 -ml soluţie de tiosulfat de sodiu consumaţi pentru titrarea probei de control;

n_2 -ml soluţie de tiosulfat de sodiu consumaţi pentru titrarea probei de analizat;

F - factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu;

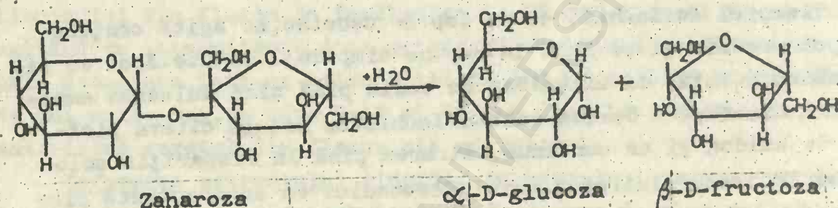
v - volumul de filtrat luat pentru determinarea glucide-

lor reducătoare,în ml;

a - greutatea materialului vegetal,în grame.

8.1.2.DOZAREA ZAHAROZEI

In toate plantele,mai ales în sfecla de zahăr şi trestia de zahăr,de asemenea în legume,fructe etc.,alături de glucidele reducătoare se găseşte în cantitate însemnată zaharoza,care nu are proprietăţi reducătoare.Pentru determinarea acestei diglucide este necesară hidroliza ei prealabilă,care se realizează sub acţiunea HCl şi decurge după schema :



Zaharoza α-D-glucoza β-D-fructoza

Reactivi.1.Reactivii 1-7 utilizaţi pentru dozarea glucidelor reducătoare;

2.Soluţie de HCl 5%;

3.Soluţie saturată de carbonat de sodiu;

4.Soluţie de roşu de metil ca indicator :0,1 g de roşu de metil se dizolvă în 30 ml alcool etilic 96% şi se diluează la 50ml cu apă distilată.

Modul de lucru.Pentru determinarea zaharozei se măsoară 1-5 ml filtrat pregătit pentru analiza glucidelor reducătoare (obţinut după precipitarea excesului de acetat de plumb cu soluţie de sulfat de sodiu în extractul defecat),într-un flacon conic de 100 ml şi se completează cu apă distilată la 25 ml.

In flacon se adaugă 2,5 ml soluţie de HCl 5%.Apoi,flaconul se introduce într-o baie de apă la fierbere şi se menţine timp de 30 minute pentru hidroliza zaharozei.După terminarea hidrolizei,flaconul cu soluţia de cercetat se răceşte cu apă de robinet şi se neutralizează imediat cu soluţie saturată de carbonat de sodiu în prezenţa unei picături de roşu de metil.Se adaugă soluţie de carbonat pînă ce culoarea roşie a indicatorului virează în galben-auriu.După neutralizare,în soluţia obţinută se deter-

mină conţinutul glucidelor pe aceeaşi cale descrisă pentru glucidele reducătoare.Rezultatul,reprezentînd suma glucidelor reducătoare şi a zaharozei se calculează după formula (8.1).Scăzînd din această sumă cantitatea glucidelor reducătoare aflăm conţinutul zaharozei în materialul analizat.

Importanţa practică.Determinarea cantitativă a monoglucidelor şi diglucidelor în organismele vegetale îşi găseşte utilizare în practica de ameliorare şi selecţionare a unor noi soiuri de plante.Investigaţia biochimică poate evidenţia noile însuşiri dobîndite de un soi sau altul de plante pe parcursul selecţiei, indicîndu-l pe cel mai corespunzător cerinţelor practicii agricole.

In plus,folosirea pe scară largă a diferitelor substanţe chimice în agricultură(fitohormoni,erbicide,antidăunători etc.) poate să influenţeze biochimismul plantelor tratate şi atunci, este necesară cunoaşterea modificării diferiţilor indicatori biochimici,inclusiv a conţinutului de monoglucide şi diglucide.

De asemenea, determinînd cantitatea glucidelor solubile în produsele agricole supuse păstrării şi conservării sau prelucrărilor tehnologice,biochimistul poate recomanda condiţiile optime,care să asigure pierderea minimă a acestor constituenţi chimici.

8.2.DOZAREA GLUCOZEI

In sîngele normal se găseşte o cantitate relativ constantă de glucoză,cunoscută sub numele de zahăr sanguin sau glicemie.De fapt,împreună cu glucoza în sînge se află şi alte glucide(fructoză,glicogen etc.),însă în cantităţi neglijabile.Intr-o serie de boli este important să se cunoască starea metabolismului glucidic,al cărui indicator principal poate fi considerat conţinutul de glucoză în sînge.

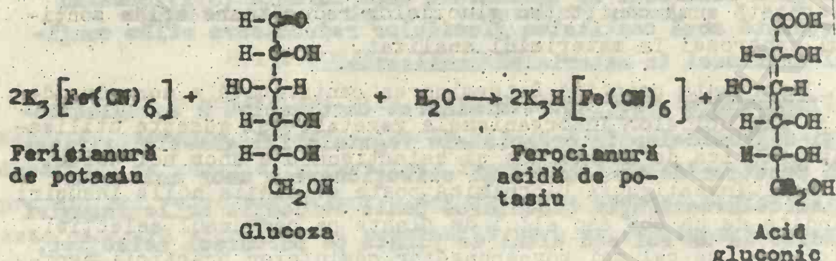
8.2.1.METODA HAGEDORN-JENSEN

Principiul metodei.Proteinele conţinute în sînge sînt precipitate cu ajutorul hidroxidului de zinc obţinut prin adăugarea sulfatului de zinc la soluţia de hidroxid de sodiu :



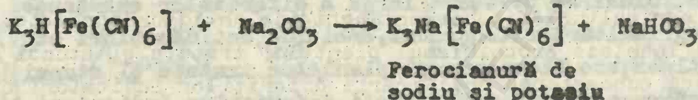
$$ZnSO_4 + 2NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + Zn(OH)_2$$

Glucoza prezentă în filtratul defecat reduce, în soluţie alcalină şi prin fierbere, fericianura de potasiu în ferocianură de potasiu după schema :



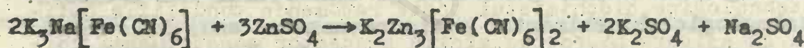
$$2K_3[Fe(CN)_6] + \text{glucoza (H–C=O, H–C–OH, HO–C–H, H–C–OH, H–C–OH, CH}_2\text{OH)} + H_2O \longrightarrow 2K_3H[Fe(CN)_6] + \text{acid gluconic (COOH, H–C–OH, HO–C–H, H–C–OH, H–C–OH, CH}_2\text{OH)}$$

Deoarece soluţia de fericianură conţine şi carbonat de sodiu, are loc următoarea reacţie de neutralizare :



$$K_3H[Fe(CN)_6] + Na_2CO_3 \longrightarrow K_3Na[Fe(CN)_6] + NaHCO_3$$

Ferocianura, astfel rezultată se precipită cu sulfat de zinc sub formă de sare dublă de zinc şi potasiu pentru a nu disocia îndărăt în fericianură :



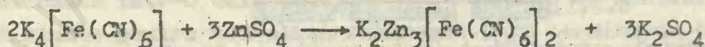
$$2K_3Na[Fe(CN)_6] + 3ZnSO_4 \longrightarrow K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2 + 2K_2SO_4 + Na_2SO_4$$

Fericianura de potasiu, fiind luată în exces, este redusă proporţional cu cantitatea de glucoză prezentă în sînge (în filtrat). Excesul de fericianură, care nu a reacţionat cu glucoza, se titrează iodometric. Fericianura în exces este redusă cantitativ de către iodura de potasiu în ferocianură, eliberîndu-se o cantitate echivalentă de iod :



$$2K_3[Fe(CN)_6] + 2KI \longrightarrow 2K_4[Fe(CN)_6] + I_2$$

Intrucît, această reacţie este reversibilă, ea se efectuează în prezenţa sulfatului de zinc, care formează cu ferocianura un complex insolubil :



$$2K_4[Fe(CN)_6] + 3ZnSO_4 \longrightarrow K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2 + 3K_2SO_4$$

Iodul eliberat astfel se titrează apoi cu tiosulfat de sodiu în prezenţa amidonului drept indicator :



$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Cu ajutorul tabelului Hagedorn-Jensen,după cantitatea de tiosulfat consumată la titrare se determină conţinutul de glucoză în sînge.

Reactivi.1.Soluţie hidroxid de sodiu N/10.Se cîntăreşte la balanţa tehnică 4,5 g de NaOH şi după ce se spală repede de 3-4 ori cu apă distilată în scopul îndepărtării stratului de carbonat de la suprafaţă,se dizolvă în 1000 ml apă distilată.

2.Soluţie stoc de sulfat de zinc cristalizat p.a.45%.Se păstrează în sticlă brună.

3.Soluţie sulfat de zinc 0,45%.Se preparăcu cel mult opt zile înainte de întrebuinţare prin diluarea soluţiei stoc(reactiv2). Intr-un balon cotat de 100 ml se măsoară 1 ml soluţie stoc de sulfat de zinc şi se completează la semn cu apă distilată.

4.Soluţie fericianură de potasiu N/200 : se cîntăreşte la balanţa analitică 0,825 g de fericianură de potasiu,se trece într-un balon cotat de 500 ml şi se dizolvă în apă distilată.Se adaugă în balon 5,3 g carbonat de sodiu anhidru,se dizolvă şi se completează la semn cu apă distilată.Soluţia se prepară cu 2-3 zile înainte de întrebuinţare şi se păstrează în sticlă brună. Reactivul este stabil circa două luni după preparare.

5.Soluţie de iodură de potasiu,sulfat de zinc şi clorură de sodiu.Se prepară întîi soluţia de sulfat de zinc şi clorură de sodiu : 10 g de sulfat de zinc şi 50 g de clorură de sodiu se dizolvă în 250 ml de apă distilată şi se filtrează.In momentul utilizării,la volumul necesar de soluţie(cîte 3 ml pentru fiecare determinare) se adaugă 2,5% iodură de potasiu(de exemplu,în 10 ml soluţie de sulfat de zinc şi clorură de sodiu se dizolvă 0,25 g de iodură de potasiu).

6.Soluţie acid acetic 3%.Se măsoară cu o pipetă 3 ml de acid acetic glacial într-un balon cotat de 100 ml şi se completează la semn cu apă distilată.

7.Soluţie de amidon 1%(pag.73)

8.Soluţie de tiosulfat de sodiu N/200.Se prepară pentru fiecare determinare diluînd de 20 de ori o soluţie de tiosulfat de sodiu N/10(5 ml soluţie de tiosulfat de sodiu se diluează la

100 ml cu apă distilată fiartă). Inainte de întrebuinţare, se determină factorul soluţiei de tiosulfat N/200 utilizînd o soluţie de dicromat de potasiu N/200(0,2452 g $K_2Cr_2O_7$ în 1000 ml apă distilată) sau de iodat de potasiu N/200(0,1783 g KIO_3 în 1000 ml apă distilată). In cazul folosirii soluţiei de dicromat se procedează astfel : într-o eprubetă de glicemie(eprubetă cu diametrul de 3 cm) se măsoară 2 ml acid sulfuric 10%. In această soluţie se dizolvă 0,1 g iodură de potasiu. Apoi, se adaugă exact 2 ml soluţie de dicromat de potasiu N/200, 2 picături de soluţie de amidon şi se titrează iodul cu soluţie de tiosulfat de sodiu N/200 din microbiuretă pînă la decolorare.

Dacă se foloseşte soluţia de iodat de potasiu, se măsoară într-o eprubetă de glicemie 2 ml soluţie de iodat de potasiu N/200, 2 ml acid acetic 3% şi 3 ml soluţie de iodură de potasiu-sulfat de zinc-clorură de sodiu. Se adaugă două picături de soluţie de amidon şi se titrează iodul eliberat cu tiosulfat N/200 din microbiuretă pînă la decolorare.

In cazul soluţiei de tiosulfat de sodiu exact N/200 se consumă pînă la decolorare 2 ml soluţie de tiosulfat . Dacă acest lucru nu se întîmplă, se află factorul soluţiei după formula $F=\frac{2}{n}$, în care n reprezintă mililitri soluţie de tiosulfat consumaţi. De exemplu, s-au utilizat 1,98 ml soluţie de tiosulfat. Factorul va fi $F= \frac{2,00}{1,98} = 1,01$.

La dozarea glucozei, cifrele aflate în titrări pentru soluţia de tiosulfat se vor corecta, înmulţindu-le cu acest factor.

<u>Modul de lucru</u>. a) <u>Precipitarea proteinelor sanguine</u>. In două eprubete(180/18 mm) se introduc cîte 5 ml soluţie de sulfat de zinc 0,45% şi cîte 1 ml soluţie de hidroxid de sodiu N/10.

Determinarea glucozei se efectuează în probele de sînge proaspăt recoltat într-o eprubetă pe fluorură de sodiu⁺ (2 mg de NaF pentru fiecare ml de sînge) prin puncţie venoasă în plica cotului sau direct în sîngele recoltat prin înţeparea pulpei dege-

⁺Fluorura de sodiu prezintă unele avantaje faţă de alţi agenţi anticoagulanţi(heparină, oxalaţi etc). Ea precipită calciul, inhibă secreţia leucocitară şi blochează glicoliza.

tului sau lobului urechii.

Se umple o micropipetă de 0,1ml cu sînge proaspăt. Vîrful micropipetei se şterge atent cu puţină vată curată de sîngele rămas pe suprafaţa exterioară, apoi se tamponează uşor pînă cînd nivelul sîngelui ajunge în micropipetă la diviziunea corespunzătoare de 0,1 ml. Conţinutul micropipetei se suflă în eprubeta nr.1 cu $ZnSO_4$ şi NaOH. Se spală micropipeta, aspirînd şi suflînd soluţia din eprubetă pînă cînd pereţii micropipetei nu mai prezintă urme de sînge. Conţinutul eprubetei nr.2 serveşte pentru determinarea substanţelor reducătoare prezente în reactivi (proba martor).

Cu ajutorul unui stativ de tablă, ambele eprubete se introduc pentru 3 minute(!) într-o baie de apă clocotindă. Proteinele sînt precipitate sub formă unor particule albe, uneori de culoare cenuşie, care sedimentează relativ repede.

Intre timp se aşază într-un stativ două eprubete de glicemie pe care se află cîte o pîlnie mică (diametrul 4-5 cm) prevăzută cu hîrtie de filtru. Se spală bine filtrele de cîteva ori cu apă distilată fierbinte, aruncînd apa de spălare.

La sfîrşitul celor 3 minute se scot eprubetele din baia de apă şi se filtrează conţinutul fiecăreia, în eprubeta de glicemie corespunzătoare. Filtratul trebuie să fie foarte limpede. Se spală eprubetele de defecare de 2 ori cu cîte 3 ml apă distilată fierbinte. Apele de spălare se aduc pe filtrele corespunzătoare. Se notează numărul şi conţinutul eprubetelor largi.

b) <u>Oxidarea glucozei şi reducerea fericianurii de potasiu</u>. După terminarea filtrării se îndepărtează pîlniile şi în fiecare eprubetă se măsoară cu pipeta exact(!) 2 ml soluţie de fericianură de potasiu N/200. Se agită uşor şi se introduc eprubetele pentru 15 minute într-o baie de apă în fierbere. In timpul acesta s-a produs reducerea fericianurii de potasiu în ferocianură de către glucoza prezentă în probă. Dacă soluţia din eprubeta nr.1 se decolorează complet după fierbere, se reface proba cu o cantitate mai mică de sînge. După 15 minute, eprubetele se scot din baia de apă şi se răcesc la curent de apă.

c) <u>Determinarea excesului de fericianură de potasiu neredusă</u>. După răcire se adaugă în fiecare eprubetă cîte 3 ml soluţie de $ZnSO_4$ şi NaCl preparată cu KI (reactiv 5), 2 ml soluţie de acid

ic 3% şi 2-3 picături de soluţie de amidon 1%.Conţinutul eprubetelor,după adăugarea acestor reactivi,se colorează în albastru.Probele se titrează cu tiosulfat de sodiu N/200 dintr-o microbiuretă de 2 ml adăugînd soluţia picătură cu picătură şi agitînd uşor pînă la dispariţia culorii albastre.Virajul se urmăreşte pe un fond alb.Se notează numărul de ml de soluţie de tiosulfat utilizaţi.

Martorul(eprubeta fără sînge) trebuie să consume pentru titrare,cel puţin 1,80 ml soluţie de tiosulfat,altfel nu sînt buni reactivii sau filtrul n-a fost bine spălat.

Calculul rezultatelor.După ce se corectează cifrele obţinute la titrare,înmulţindu-le cu factorul F al soluţiei de tiosulfat, se caută în tabelul Hagedorn-Jensen cantitatea de glucoză în mg%. Pentru aceasta în prima coloană verticală din stînga tabelului Hagedorn-Jensen se caută cifra corespunzătoare numărului de mililitri de soluţie de tiosulfat de sodiu N/200 folosiţi pentru titrarea probei,citindu-se întregul şi prima zecimală.Cea de-a doua zecimală se caută în prima coloană orizontală delimitată de chenar.Cifra găsită la intersecţia dreptelor care pleacă de la cele două valori corespunde cantităţii de glucoză exprimată în mg%.Din valoarea citită pentru proba cu sînge se scade valoarea obţinută pentru martor şi astfel se găseşte cantitatea de glucoză în 100 ml sînge,deci în mg%.

Observaţii.1.Este recomandabil ca atît proba de cercetat, cît şi martorul să se facă în dublu exemplar.

2.Analiza se poate întrerupe pentru cîteva ore după filtrare(înainte de adăugarea fericianurii).

3.Metoda Hagedorn-Jensen este relativ nespecifică,întrucît fericianura de potasiu reacţionează,în afară de glucoză şi cu alte substanţe reducătoare prezente în mod normal în sînge,de exemplu,acidul uric,creatinina,glutationul etc.Acesta nu este un inconvenient prea mare,deoarece concentraţia substanţelor reducătoare prezente în sînge,cu excepţia glucozei,este relativ constantă,metoda permiţînd evaluarea justă a oscilaţiilor survenite exclusiv în concentraţia glucozei sanguine.

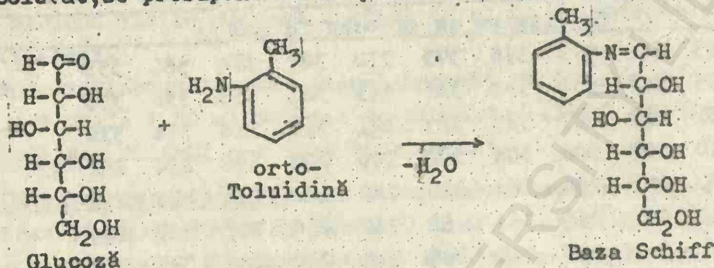
Tabelul 8.1

Tabelul Hagedorn-Jensen pentru calcularea cantităţii de glucoză

Soluţie $Na_2S_2O_3$ N/200	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
	Cantitatea de glucoză în mg%									
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	335
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

8.2.2. MICROMETODA COLORIMETRICA CU ORTO-TOLUIDINA.

Principiul metodei. Glucoza reacţionează la cald, în soluţie de acid acetic, cu orto-toluidina, dînd un compus colorat în verde cu maximum de absorbţie la 630 nm. In ce priveşte natura compusului colorat, se presupune că el poate fi o bază Schiff :



Reactivi. 1. Orto-Toluidină pură. Reactivul trebuie să fie incolor sau slab colorat în galben. Se păstrează în frigider într-un vas de sticlă brună, închis ermetic. Orto-Toluidina avînd culoarea galbenă sau roşietică se purifică prin distilare (pe o plită electrică cu sită de asbest sau pe baie electrică cu nisip). Este recomandabil ca orto-toluidina să se distile în vid, întrucît la temperatura de fierbere de +200,2°C ea se descompune. La o presiune de 80 mm coloană de mercur, temperatura de fierbere a orto-toluidinei are valoarea 121°C, devenind posibilă obţinerea reactivului incolor.

2. Acid acetic glacial.

3. Tiouree

4. Reactiv orto-toluidinic. Se dizolvă 0,15 g tiouree în 94 ml acid acetic glacial. Soluţia obţinută se amestecă cu 6 ml orto-toluidină incoloră sau slab colorată în galben. Reactivul orto-toluidinic este stabil şi se păstrează la rece.

5. Soluţie de acid tricloracetic 3%.

6. Soluţie de acid benzoic 0,2%. Se dizolvă 0,2 g de acid benzoic cristalizat în 50 ml apă distilată, prin încălzire pe baia de apă. După răcire la temperatura camerei, soluţia se transvazează într-un balon cotat de 100 ml şi se completează la semn cu apă distilată.

7. Soluţie etalon de glucoză. Se prepară în momentul utiliză-

rii,dizolvînd 100 mg de glucoză p.a. anhidră în 100 ml soluţie de acid benzoic 0,2%.Se conservă în frigider.

Modul de lucru.Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,9 ml soluţie de acid tricloracetic 3% şi se adaugă 0,1 ml sînge.Se agită şi se centrifughează 10 minute la 3000 rotaţii/min.In paralel se pregăteşte o probă etalon conţinînd 0,9 ml soluţie de acid tricloracetic 3% şi 0,1 ml soluţie etalon de glucoză 100 mg%(în cazul unui conţinut ridicat de zahăr în sînge se utilizează o soluţie etalon de glucoză cu concentraţia 300 sau 500 mg%).Apoi,în 3 eprubete uscate de 16x160 mm se introduc separat 0,5 ml supernatant şi 0,5 ml soluţie din proba etalon.Intr-o a treia eprubetă se măsoară 0,5 ml soluţie de acid tricloracetic 3%.Această probă va servi pentru controlul reactivilor(nu este totdeauna necesar).

In toate eprubetele se adaugă cîte 4,5 ml soluţie de orto-toluidină(reactiv 4).Eprubetele se introduc pentru 10 minute(!) într-o baie de apă la fierbere.

După acest interval de timp,eprubetele se răcesc în apă de robinet pînă la temperatura camerei.Probele cu sînge şi cu soluţie etalon se fotometrează la 630 nm(filtru roşu),folosind pentru compensaţie proba de control sau apa distilată(deoarece extincţia probei de control a reactivilor practic este zero).

Observaţie.Cu scopul economisirii de reactivi,se recomandă adăugarea a 2 ml reactiv orto-toluidinic(reactiv 4) la 0,5 ml supernatant.Această variantă se poate aplica şi în cazul sîngelui cu un conţinut ridicat de zahăr,dacă un volum determinat de centrifugat(0,1-0,2 ml) se diluează cu ser fiziologic la 0,5 ml,care se supune operaţiilor descrise în modul de lucru.La calcularea rezultatelor se va ţine seama de gradul de diluţie.

Calculul rezultatelor.Cantitatea de glucoză,exprimată în mg, în 100 ml sînge se poate calcula după formula :

$$X = \frac{E_s}{E_e} \cdot 100 \quad ,$$

unde : E_s - extincţia probei cu sînge ;

E_e - extincţia probei cu glucoză şi

100 - concentraţia glucozei în proba etalon.

Dacă extincția probei cu sînge depășește valoarea de 0,8, sîngele se va dilua în mod corespunzător.

Variații fiziopatologice. In sîngele omului sănătos glicemia variază între 60-110 mg glucoză/100 ml.

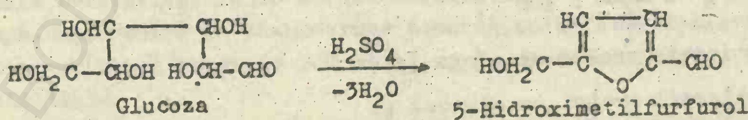
Determinarea glicemiei are o importanță deosebită pentru explorarea modificărilor metabolismului glucidelor sub influența diferiților factori de natură fiziologică sau patologică. Creșterea cantității de glucoză în sînge(hiperglicemie) este cauzată de emoții, frig, altitudine, schimbarea climatului, precum și de alimentație. Intrebuințarea unor medicamente, ca morfina, atropina, anestezia cu eter și cloroform produc și ele o ușoară hiperglicemie. Scăderea cantității de glucoză în sînge(hipoglicemie) se observă în efortul muscular deosebit.

In patologie întîlnim variația glicemiei într-o serie de boli. Astfel, diabetul zaharat, hiperfuncția medulosuprarenalei sau adenohipofizei, unele tulburări ale sistemului nervos central sînt însoțite de hiperglicemie, iar hiperinsulinismul, inaniția, boala lui Addison, insuficiența funcțională a hipofizei, diferite boli ale ficatului etc., de hipoglicemie.

8.3. DETERMINAREA CANTITATIVA A GLICOGENULUI

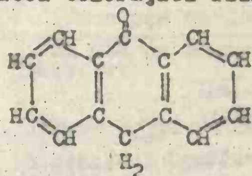
Glicogenul, polimer al alfa-D-glucozei, reprezintă forma principală de rezervă a glucidelor în organismul animal. Prezența glicogenului a fost dovedită în toate organismele animale aflate pe diferite trepte de dezvoltare evolutivă. La animalele superioare cel mai bogat organ în glicogen este ficatul. In cantitate mai mică această poliglucidă se găsește în mușchi, creier etc.

Principiul metodei. Tesutul animal este supus desmolizei la cald, în soluție puternic alcalină. Glicogenul conținut în desmolizat, în prezența acidului sulfuric concentrat, este scindat în glucoză, care se deshidratează cu formarea 5-hidroximetilfurfurolului:



Prin condensarea hidroximetilfurfurolului cu antrona rezultă un

derivat chimic care colorează soluţia în verde-albăstrui,intensitatea coloraţiei fiind proporţională cu concentraţia glucozei



Antrona

obţinută în urma degradării glicogenului tisular.Condensarea se realizează între grupa aldehidică a hidroximetilfurfurolului şi grupa metilenică activă din molecula antronei.

Reactivi.1.Soluţie de hidroxid de potasiu 30%.

2.Soluţie de acid sulfuric 95%.La 5 ml apă distilată se adaugă cu atenţie 100 ml acid sulfuric concentrat şi se răceşte.

3.Soluţie de antronă 0,2% în acid sulfuric 95%.Se dizolvă 0,2 g antronă în 100 ml soluţie de acid sulfuric 95%.Reactivul (3) este puţin stabil şi se prepară cu 1 oră înainte de utilizare.Se poate folosi numai în ziua efectuării determinării.

Modul de lucru.Intr-o eprubetă(cu dimensiunile de 20x150mm) din sticlă termorezistentă se măsoară 3 ml soluţie de hidroxid de potasiu,se închide cu un dop de cauciuc şi se cîntăreşte.Apoi, se introduce în eprubetă o cantitate de 0,1-0,5 g de ficat tăiat în bucăţi mici,se închide eprubeta şi se cîntăreşte.După diferenţa între cele două cîntăriri se află cantitatea exactă a ţesutului recoltat.Se scoate dopul şi eprubeta se introduce pentru 20 de minute în baia de apă în fierbere.După răcire cu apă de robinet,conţinutul eprubetei se trece într-un balon cotat de 100-250 ml,spălînd de mai multe ori cu apă distilată,se completează la semn şi se agită puternic.

Din soluţia de glicogen obţinută astfel se măsoară 0,5-5,0 ml într-o eprubetă(cu dimensiunile de 30x200 mm) din sticlă termorezistentă şi se completează pînă la 5 ml cu apă distilată (4,5-0,0 ml).In acelaşi timp în altă eprubetă identică se măsoară 5 ml apă distilată pentru martor.Ambele eprubete se introduc într-o baie de apă cu gheaţă.După răcire,în fiecare eprubetă se adaugă,agitînd continu cu atenţie,dintr-o biuretă,sub formă de jet subţire cîte 10 ml soluţie proaspăt preparată de antronă în acid sulfuric 95%.Eprubetele se acoperă cu o pară de sticlă şi se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă în fierbere.

A ,eprubetele se răcesc în apă cu gheaţă şi se determină imediat extincţia probei cu glicogen în raport cu martorul cu ajutorul unui fotoelectrocolorimetru la lungimea de undă egală cu 620 nm sau utilizînd filtrul roşu.

Calculul rezultatelor. După valoarea extincţiei citite se găseşte pe curba etalon cantitatea de glicogen în volumul de soluţie luat pentru reacţia de culoare. Apoi, se calculează conţinutul glicogenului, exprimat în mg%, în ţesutul studiat folosind formula :

$$X = \frac{a.V.100}{v.p} \text{ mg\%},$$

unde a -cantitatea de glicogen, în mg, găsită pe curba etalon ;

V -volumul(ml) la care s-a diluat desmolizatul obţinut în urma tratamentului cu hidroxid de potasiu ;

v -volumul soluţiei de glicogen(ml) luat pentru reacţia de culoare ;

p -greutatea ţesutului analizat, în g ;

100 -coeficient de transformare în procente(%).

Construirea curbei etalon. Pentru construirea curbei etalon se utilizează o soluţie standard de glicogen, care se prepară dizolvînd exact 40 mg de glicogen într-un balon cotat de 500 ml în apă distilată fierbinte. După răcirea soluţiei la temperatura camerei, se completează volumul la semn cu apă distilată şi se agită. Această soluţie conţine 0,08 mg de glicogen într-un ml. Din soluţia obţinută se prepară o serie de probe pentru trasarea curbei etalon, măsurînd în eprubete perfect uscate(cu dimensiunile de 30x200 mm) volumele de soluţie indicate în tabelul 8.2.

Este recomandabil ca adăugarea soluţiei de antronă să se efectueze la un interval determinat de timp(de exemplu, 5 minute) de la o eprubetă la următoarea din serie. După ce eprubetele se răcesc la temperatura camerei, se citesc extincţiile la un fotoelectrocolorimetru ,la lungimea 620 nm(filtru roşu).

Rezultatele obţinute la citirea probelor etalon la fotocolorimetru sînt utilizate pentru construirea curbei etalon, înscriindu-se pe ordonată valorile extincţiei E şi pe abscisă concentraţia glicogenului în probe, exprimată în mg.

Tabelul 8.2

Reactivi	Numărul probei								
	Control	1	2	3	4	5	6	7	8
Cantitatea de glicogen în probă(mg)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,16	0,20
Soluţie standard de glicogen(ml)	0	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,00	2,50
Apă distilată (ml)	5,0	4,75	4,50	4,25	4,00	3,75	3,50	3,00	2,50
Probele sînt răcite în baia de apă cu gheaţă									
Soluţie de antronă (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Probele se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă la fierbere şi apoi sînt răcite în apă de robinet									

Importanţa practică.Determinarea conţinutului de glicogen în diferite organe are o valoare deosebită pentru investigarea stărilor fiziologice şi patologice ale organismului animal,precum şi pentru cercetarea influenţei anumitor factori asupra metabolismului glucidic.

8.4. DETERMINAREA ACTIVITATII UNOR ENZIME ALE METABOLISMULUI GLUCIDELOR

8.4.1. DETERMINAREA ACTIVITATII AMILAZELOR

Amilazele catalizează hidroliza legăturilor α-1,4-glicozidice în α-glucanii de tipul amidonului şi glicogenului sau în produşii lor de scindare. După acţiunea acestor enzime asupra substratului se deosebesc trei tipuri de amilaze :

1) <u>α-amilaza</u>(α-1,4-glucan-glucanohidrolaza,E.C.3.2.1.1) scindează legăturile α-1,4-glicozidice în amidon şi glicogen,cu formarea de oligoglucide(dextrine) şi o cantitate determinată de maltoză ;

2) <u>β-amilaza</u>(α-1,4-glucan-maltohidrolaza,EC.3.2.1.2) hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice în amidon şi poliglucidele asemănătoare,eliberînd succesiv resturile de β-maltoză de la capătul nereducător al lanţului poliglucidic ;

3) <u>γ-amilaza</u> sau <u>glucoamilaza</u>(α-1,4-glucan-glucohidrolaza, EC 3.2.1.3) hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice în amidon, glicogen,dextrani etc.,scindînd succesiv resturile de glucoză de la capătul nereducător al moleculei de polizaharidă.

α-Amilaza este răspîndită în organismele animale,în plante, ciuperci şi bacterii. β-Amilaza a fost evidenţiată în unele plante superioare : orz,soia,grîu,porumb,cartofi şi altele. γ-Amilaza se găseşte larg răspîndită la microorganisme şi în ţesuturile animale.

Metodele de determinare a activităţii amilazelor se bazează, fie pe dozarea maltozei şi glucozei formate din amidon,fie pe estimarea cantităţii de amidon nescindat,utilizînd în acest scop reacţia lui cu iodul.

8.4.1.1. DETERMINAREA ACTIVITATII α-AMILAZEI IN SERUL SANGUIN SI URINA

In organismul animal α-amilaza se sintetizează predominant la nivelul pancreasului şi glandelor salivare ,de unde trece în sînge şi se elimină pe cale renală. α-Amilaza de provenienţă

animală este activată de ionii de clor în concentrație de 0,01 M și inhibată de ionii de citrat și oxalat.

Determinarea activității α-amilazei în ser,urină și în sucul duodenal constituie un important test pentru explorarea fiziopatologică a pancreasului.

MICROMETODA MARAIS SI BIETH

Principiul metodei.Alfa-amilaza hidrolizează în timp de 30 minute,la 37°C,o soluție tampon de amidon.La sfîrșitul perioadei de incubație,amidonul rămas nescindat este dozat fotometric la 580 nm după colorația violet pe care o dă această poliglucidă cu iodul.

Reactivi.1.Soluție tampon de fosfați M/15 cu pH 7,4.Se amestecă 81,8 ml soluție de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ M/15(23,8813 g/1000 ml) cu 18,2 ml soluție de KH_2PO_4 M/15(9,078 g în 1000 ml).Se conservă la + 4°C.

2.Soluție stoc de amidon 1%.Se dizolvă 1 g de amidon solubil în 100 ml soluție tampon de fosfați(reactiv 1).Soluția de amidon se fierbe cîteva minute pentru distrugerea microorganismelor. Această soluție este stabilă cîteva săptămîni dacă se conservă la + 4°C.

3.Soluție de iod N/3000.Se prepară extemporaneu prin diluarea unei soluții de iod N/10.Pentru a obține 100 ml soluție de iod N/3000 se diluează într-un balon cotat 0,33 ml soluție de iod N/10 la 100 ml cu apă distilată.

4.Soluție de acid clorhidric 1N.Se diluează 9 ml de acid clorhidric concentrat(d=1,19) la 100 ml cu apă distilată,într-un balon cotat.

Modul de lucru.a)Diluarea lichidelor biologice.In mod normal determinarea activității α-amilazei se face cu :

-ser nediluat ;

-urină diluată 1/3 cu ser fiziologic și

-suc duodenal diluat cu ser fiziologic pînă la o activitate potrivită.

b)Determinarea activității alfa-amilazei.In momentul efectuării lucrării se prepară o soluție de amidon 0,3% din soluția stoc de amidon(2),prin diluare cu o soluție tampon 30%.

In două eprubete se pipetează cantitățile de reactivi indicate în tabelul 8.3.

Tabelul 8.3

Reactivi	Proba	
	Cercetat	Control
Soluție de amidon 0,3%(ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute într-un termostat la 37°C		
Lichid biologic de analizat(ml)	0,02	-
Se incubează exact 30 minute la 37°C		
Soluție de acid clorhidric 1N(ml)	0,10	0,10
Lichid biologic de analizat(ml)	-	0,02
Apă distilată(ml)	2,00	2,00
Soluție de iod N/3000(ml)	10,00	10,00

Se agită și se citește extincția probei de control(E_1) și a probei de cercetat(E_2) la un electrofotocolorimetru la lungimea de undă egală cu 580 nm,folosind pentru compensație soluția de iod N/3000.

Calculul rezultatelor.Activitatea alfa-amilazei se exprimă în unități Wohlgemuth într-un ml(U.W/ml) și reprezintă numărul mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute,la 37°C,de un ml de lichid biologic.

Extincția E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon.Diferența E_1-E_2 reprezintă cantitatea de amidon hidrolizat sub acțiunea amilazei din 0,02 ml lichid de cercetat.Cantitatea(X) de amidon hidrolizat, exprimată în mg,în timp de 30 minute va fi :

$$X = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1,5$$

Pentru a obține numărul mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute,la 37°C,de enzima dintr-un ml de ser sanguin(U.W/ml) se amplifică cu 50,întrucît volumul probei de cercetat este 0,02 ml :

$$U.W/ml = \frac{E_1 - E_2}{E_1} .1,5.50$$

La determinarea activităţii α-amilazei în urină sau sucul duodenal se va ţine seama de diluarea lichidului biologic efectuată eventual.

Observaţii.1.Dacă extincţia E_2 este mai mică decît jumătatea extincţiei E_1($E_2=\frac{E_1}{2}$) se diluează lichidul biologic cu ser fiziologic pînă la o activitate corespunzătoare şi se repetă determinarea.

2.Pentru determinarea activităţii α-amilazei se recomandă să se folosească serul sanguin şi urină proaspete.O hemoliză uşoară nu influenţează rezultatul cercetării.

Importanţa practică.Amilazemia(activitatea amilazei serice) are valorile normale cuprinse între 4,5 şi 10,1 U.W/ml.In practică se admit valori anormale acele care depăşesc de două ori valorile fiziologice,adică 15 U.W/ml,ca şi valorile de trei ori mai mari care sînt net patologice(22 U.W/ml).

Amilazuria(activitatea amilazei în urină) variază foarte puternic,în funcţie de volumul urinii din 24 de ore : $43,5 \pm 16,5$U.W/ml.

Creşterea activităţii amilazei se întîlneşte,mai ales,în bolile pancreasului.In pancreatita acută activitatea amilazei serice şi urinare se măreşte de 10-30 ori.Hiperamilazemia se instalează imediat după începerea bolii,înregistrează maximul la 12-24 de ore şi apoi scade repede revenind la normal în 2-6 zile.De obicei hiperamilazuria se prelungeşte mai mult decît creşterea activităţii enzimei în serul sanguin.

Pancreatitele cronice,cancerul pancreasului nu duc la o creştere pronunţată a activităţii α-amilazei sanguine şi pentru diagnosticarea lor se utilizează aşa-numitele probe provocate. Activitatea amilazică poate fi mărită într-o serie de maladii care au un tablou clinic asemănător cu pancreatita acută:apendicita acută,peritonita,ulcerul perforat al stomacului,ocluzia intestinală,colecistita acută.In cazul peritonitelor activitatea amilazică se datoreşte amilazei sintetizate de bacterii.Activitatea

enzimei în bolile indicate se intensifică de 3-5 ori .

Deci, hiperamilazemia puternic exprimată permite diferenţierea pancreatitei acute nu numai de bolile cronice ale pancreasului, ci şi de alte afecţiuni.

Aproape totdeauna amilazemia este însoţită de amilazurie, însă determinarea activităţii amilazice urinare este un indicator diagnostic mai puţin exact, întrucît eliminarea amilazei în urină poate fi corelată cu funcţia rinichilor.

Creşterea activităţii amilazei serice în bolile cronice ale rinichilor şi în uremiile acute se poate explica prin diminuarea sau lipsa eliminării enzimei pe cale renală.

Determinarea activităţii amilazei în sînge şi urină poate oferi unele indicaţii asupra stării funcţionale a aparatului renal. In nefroze, glomerulonefrite etc., activitatea amilazică a sîngelui este crescută, iar cea a urinii scade sub valoarea normală. Coeficientul amilazemie/amilazurie poate sluji ca un indicatcr al realizării depline a procesului de filtrare glomerulară.

O altă maladie caracterizată prin ridicarea însemnată a activităţii amilazei în sînge este parotidita, dar tabloul clinic clar al acesteia dă posibilitatea diferenţierii hiperamilazemiei. Administrarea cortisonei sau ACTH intensifică activitatea enzimei de cîteva ori.

In afecţiunile ficatului (hepatite, ciroze, intoxicaţii, tumori canceroase şi metastazele lor în ficat), se observă scăderea activităţii amilazice a sîngelui. Hipoamilazemia, de asemenea, se observă în arsurile întinse ale pielii, diabetul zaharat, dispepsii, caşexii etc.

8.4.1.2. DETERMINAREA ACTIVITATII α-AMILAZEI SI β-AMILAZEI IN PLANTE

In plante se întîlnesc α- şi β-amilaze, a căror activitate creşte apreciabil în timpul germinaţiei seminţelor conţinînd o cantitate mare de amidon. Creşterea activităţii amilazice în timpul germinaţiei seminţelor de graminee se explică în cazul α-amilazei prin sinteza *de novo* a enzimei, iar pentru β-amilază este specifică activarea zimogenului ei sub influenţa stimulatorilor naturali de creştere din clasa giberelinelor şi auxinelor.

METODA NOELTING-BERNFELD

Principiul metodei. α-Amilaza sau β-amilaza hidrolizează amidonul cu formare de maltoză liberă.Aceasta reduce acidul 3,5-dinitrosalicilic la acid 3-amino-5-nitrosalicilic de culoare oranj care este determinat colorimetric la 540 nm.In paralel cu proba de analizat se efectuează un control cu extract enzimatic pentru substanţele reducătoare ce le-ar putea conţine eventual.

Reactivi.1.Soluţie tampon acid citric-citrat trisodic 0,1M cu pH 5,6.Intr-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 2,8789 g acid citric($C_6H_8O_7.H_2O$) în circa 100 ml apă distilată şi apoi se introduc 12,9649 g citrat trisodic($C_6H_5Na_3 5\frac{1}{2}H_2O$) folosind 200-300 ml apă distilată.Inainte de completarea volumului balonului cotat la semn(500 ml) cu apă distilată,se verifică pH-ul soluţiei cu ajutorul pH-metrului şi dacă este cazul se corectează cu soluţie de NaOH 1N sau cu soluţie de acid citric.

2.Soluţie de amidon 2%.Suspensia obţinută prin amestecarea a 2 g de amidon cu 20 ml apă distilată se adaugă la 80 ml apă distilată în fierbere ;se continuă încălzirea pînă la clarificarea soluţiei.

3.Soluţie de acid 3,5-dinitrosalicilic 1%.Se amestecă 1g de acid 3,5-dinitrosalicilic cu 5-10 ml de apă distilată.La amestecul obţinut se adaugă lent şi agitîndu-se continuu 20 ml soluţie de NaOH 2N.După dizolvarea completă a reactivului,la temperatura camerei,volumul soluţiei se aduce la 50 ml cu apă distilată şi se adaugă 30 g de sare Seignette.Se agită pînă la dizolvarea tartratului dublu de sodiu şi potasiu,se completează volumul soluţiei la 100 ml cu apă distilată şi se filtrează.Soluţia de acid 3,5-dinitrosalicilic se conservă în flacoane de culoare brună cu închidere ermetică pentru evitarea dioxidului de carbon, a cărui prezenţă poate diminua alcalinitatea reactivului ,influenţînd asupra rezultatelor.

4.Soluţie etalon de maltoză(200 mg maltoză se dizolvă în 100 ml apă distilată).

Modul de lucru.Extragerea α-amilazei.O cantitate bine determinată de material biologic fin omogenizat prin măcinare sau mojarare se extrage cu apă bidistilată.In cazul seminţelor de

c [illegible] eguminoase etc.,0,100-0,500 g de făină se extrag cu 5 ml apă bidistilată,răcită la +4°C.Extracţia enzimei se efectuează pe o perioadă de 30-60 minute,prin agitare cu intermitenţă(după fiecare 10 minute repaus,se agită un minut),la temperatura camerei sau mai bine într-o baie de apă cu gheaţă.Reziduul insolubil se separă de extractul enzimatic prin centrifugare timp de 15 minute la 3000 rot./min.Dacă extractul enzimatic conţine şi β-amilază, atunci el se termostatează la 70°C pentru 15 minute,apoi se răceşte repede într-un vas cu apă de robinet.Pe această cale β-amilaza se inactivează complet, α-amilaza păstrîndu-şi activitatea catalitică.

Extragerea β-amilazei.Materialul biologic fin omogenizat se extrage cu o soluţie de cisteină M/1000 în soluţie de NaCl 6% (pH 6),în raport de un gram la 10 ml,timp de 12 ore,la temperatura camerei,agitînd periodic amestecul.Extractul enzimatic se separă prin centrifugare la 3000 rot./min.,timp de 15 minute.In supernatantul obţinut poate fi prezentă atît α-amilaza cît şi β-amilaza.Inainte de determinarea activităţii β-amilazei, α-amilaza trebuie să fie inactivată.In acest scop,pH-ul extractului enzimatic,conţinînd ambele amilaze menţionate mai sus,este adus la valoarea 3,6 cu ajutorul unei soluţii de acid acetic 1N.Adăugarea soluţiei de acid acetic se face sub agitare,iar pH-ul exact se determină la un pH-metru.După coborîrea pH-ului la 3,6,amestecul se centrifughează la 3000 rot./min.,timp de 15 minute.Enzima α-amilaza inactivată prin denaturare acidă se îndepărtează sub forma precipitatului sedimentat în urma centrifugării.Supernatantul obţinut va fi utilizat drept sursă de β-amilază.

Determinarea activităţii α-amilazei sau β-amilazei.In două eprubete curate şi uscate se măsoară cîte 5 ml soluţie tampon citrat 0,1M cu pH 5,6.In prima eprubetă se pipetează 2 ml soluţie de amidon 2%,iar în a doua eprubetă-2 ml apă distilată şi se agită conţinutul lor.Prima eprubetă se introduce într-un termostat cu temperatura de 40°,pentru 10 minute.Apoi,în fiecare eprubetă se adaugă 0,5-3 ml extract enzimatic,după cum se presupune că α-amilaza sau β-amilaza este mai mult sau mai puţin activă.Conţinutul eprubetelor se agită cu atenţie.Prima eprubetă,constituind

proba de cercetat, se incubează la 40°C, timp de 30 minute(1). A doua eprubetă servește drept martor pentru diglucidele reducătoare existente eventual în extractul enzimatic. Estimarea acestor substanțe se face imediat după adăugarea extractului enzimatic în eprubeta martor, prin același procedeu ca cel folosit la dozarea maltozei formate în proba de cercetat sub acțiunea enzimei respective.

La afîrșitul termostatării probei de cercetat, aceasta se răcește 5 minute într-o baie cu apă de robinet. In incubatul răcit se dozează cantitatea de maltoză eliberată sub acțiunea α-amilazei sau β-amilazei asupra amidonului.

Dozarea maltozei. In trei eprubete uscate se măsoară cîte 1 ml soluție de acid 3,5-dinitrosalicilic 1%. Una din eprubete, notată cu C, se va utiliza pentru controlul reactivului de culoare. In a doua și a treia eprubetă se măsoară 0,5-2 ml incubat din proba de cercetat și respectiv martor. Soluția de acid 3,5-dinitrosalicilic fiind puternic alcalină, întrerupe imediat acțiunea catalitică a enzimei.

Toate cele trei eprubete se introduc într-o baie de apă la 100°C și se mențin exact 5 minute din momentul în care apa începe să fiarbă din nou. După răcirea probelor în apă de robinet, volumul lor se completează la 10 ml cu apă distilată. Se agită conținutul eprubetelor folosind un dop de cauciuc și se citesc extincțiile probei de cercetat și martorului la un fotoelectrocolorimetru, la lungimea de undă de 540 nm sau în filtru verde, față de controlul reactivului de culoare (eprubeta C).

Pentru aflarea cantității de maltoză în probe se construiește o curbă etalon, realizîndu-se o serie de eșantioane etalon în care concentrația de diglucidă variază între 0,2-1,8 mg(tabelul 8.4).

Tabelul 8.4.

Construirea curbei etalon pentru dozarea maltozei

Eprubeta	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cantitatea de maltoză(mg)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Soluţie etalon de maltoză 200 mg%(ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Apă distilată (ml)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1
Soluţie de acid dinitro-salicilic(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Eprubetele se introduc într-o baie de apă la fierbere şi se menţin 5 minute(!) din momentul în care apa începe să fiarbă din nou.După aceasta eprubetele se răcesc în apă de robinet.Se completează volumul probelor la 10 ml,prin adăugarea a cîte 7 ml apă distilată.Se agită conţinutul eprubetelor.Intensitatea culorii probelor etalon se citeşte faţă de controlul reactivilor(C), la fotoelectrocolorimetru,folosind lungimea de undă de 540 nm sau filtrul verde.

Curba etalon se construieşte trecînd pe ordonată valorile extincţiilor citite,iar pe abscisă cantitatea de maltoză în probele etalon.Punctele de întretăiere a perpendicularelor imaginare ridicate pe abscisă sau ordonată din locurile corespunzătoare valorilor concentraţiei de maltoză,respectiv extincţiei trebuie să se situeze pe o linie dreaptă.

Calculul rezultatelor.Extincţia probei de cercetat şi a martorului se extrapolează pe curba etalon,aflîndu-se cantitatea de maltoză rezultată prin acţiunea α-amilazei sau β-amilazei asupra amidonului şi respectiv cantitatea de maltoză existentă în extractul enzimatic.Din cantitatea de maltoză în proba de cercetat se scade conţinutul de maltoză al extractului enzimatic.

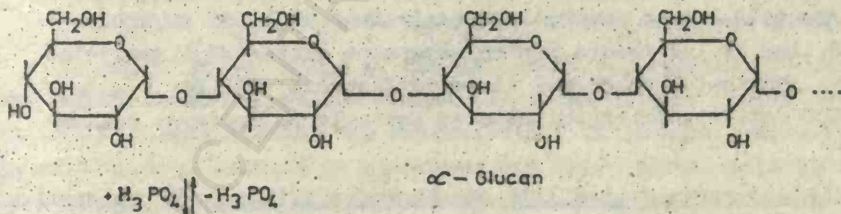
Activitatea celor două tipuri de amilază se exprimă în micromoli de maltoză care s-au format sub acţiunea enzimei,în condiţiile menţionate,la 1 g de seminţe(făină) :

$$\mu M \text{ maltoză/1g} = \frac{(a_{cer}-a_m)(7+v)V}{n.v.p.0.360},$$

în care : a_{cer}-cantitatea de maltoză(mg) corespunzătoare extincţiei probei de cercetat ;
a_m -cantitatea de maltoză(mg) corespunzătoare extincţiei martorului ;
v -volumul(ml) extractului enzimatic folosit la determinarea activităţii enzimei ;
V -volumul total(ml) al extractului enzimatic ;
n- -volumul(ml) de incubat luat pentru dozarea maltozei;
p -greutatea făinii(g) din care s-a extras enzima ;
0,360-greutatea unui micromol de maltoză exprimată în mg.

8.4.2.DETERMINAREA ACTIVITATII α-GLUCANFOSFORILAZEI VEGETALE

Enzima α-glucanfosforilaza(α-1,4-glucan: ortofosfat-glucoziltransferaza,EC 2.4.1.1),cunoscută şi sub denumirea de fosforilază,catalizează fosforoliza amidonului sau glicogenului cu formarea de glucozo-1-fosfat(esterul lui Cori),după reacţia următoatoare :



Glucozo-1-fosfat

Această reacţie este reversibilă atunci cînd α-glucanfosforilaza acţionează asupra amidonului. Insă enzima sintetizează lanţurile amilozice,pornind de la glucozo-1-fosfat,numai în

prezenţa urmelor de amidon ca iniţiator al reacţiei.

α-Glucanfosforilaza are largă răspîndire în plantele superioare(cereale,leguminoase,cartof),în organismele animale(muşchi, inimă,ficat,creier) şi în microorganisme.

Principiul metodei.Se determină scăderea cantităţii de acid fosforic în mediul de reacţie ca rezultat al fosforolizei amidonului sub acţiunea α-glucanfosforilazei.

Reactivi.1.Reactiv pentru incubaţie : se amestecă 60 ml soluţie tampon de fosfaţi M/10,pH 7,2(se prepară dizolvînd 2,5793 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ şi 0,4369 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ în 100 ml apă bidistilată) cu 100 ml soluţie de NaCl 0,9% şi 1 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,8%.

2.Soluţie de amidon 3%.Suspensia a 3 g de amidon în 20 ml apă bidistilată se amestecă cu 80 ml apă bidistilată la fierbere. Amestecul se fierbe încă 3-5 minute.

3.Soluţie de fluorură de sodiu M/10.

4.Soluţie de acid tricloracetic 10%.

Modul de lucru:Extragerea α-glucanfosforilazei.O cantitate de 0,200 g de material vegetal se macină(seminţe de cereale,leguminoase etc) sau se mojarează(cartof) cu nisip de cuarţ ori sticlă pisată,pînă la obţinerea unei pudre fine.Amestecul obţinut este trecut cantitativ,cu ajutorul a 5 ml de apă bidistilată,răcită la +4°C,într-o eprubetă de centrifugă.Se agită cu intermitenţă,timp de 120 minute.Pentru separarea extractului conţinînd enzima,conţinutul eprubetei se centrifughează timp de 15 minute, la 3000 rot./min.Extractul separat serveşte ca preparat enzimatic.

Determinarea activităţii α-glucanfosforilazei.Intr-o eprubetă curată şi uscată se măsoară un ml soluţie de amidon 3%,un ml soluţie de NaF şi 2 ml reactiv pentru incubaţie(reactiv 1).Se adaugă un ml extract enzimatic şi se agită conţinutul eprubetei. In altă eprubetă se pipetează un ml extract enzimatic(martor).Ambele probe se introduc pentru 120 minute în termostat la 37°C.

După termostatare,în fiecare eprubetă se adaugă cîte 5 ml soluţie de acid tricloracetic 10%,iar eprubeta martor se completează cu 2 ml reactiv pentru incubaţie,un ml soluţie de NaF şi un ml apă bidistilată.Conţinutul eprubetelor se agită cu grijă şi

după 15 minute de repaus,se filtrează sau se centrifughează.In filtrat(supernatant) se determină cantitatea de fosfor anorganic.

Dozarea fosforului anorganic după metoda Lowry şi Lopez în modificaţia lui Skulacev.Principiul acestei metode se bazează pe transformarea fosfatului în complex fosfomolibdenic şi reducerea acestuia cu ajutorul acidului ascorbic.Accelerarea reacţiei şi creşterea sensibilităţii metodei se realizează sub acţiunea ionilor de cupru.Formarea şi reducerea complexului fosfomolibdenic au loc în tampon acetat cu pH 4,0.In aceste condiţii combinaţiile organice fosforice labile sînt mult mai stabile.

Reactivi.1.Soluţie tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1M cu pH 4.Se amestecă 410 ml de acid acetic 0,2M cu 90 ml soluţie de acetat de sodiu($CH_3COONa.3H_2O$) 0,2M şi se completează la 1000 ml cu apă bidistilată.

2.Soluţie de acetat de sodiu 0,25M.

3.Soluţie de acid ascorbic 1% în soluţie de sulfat de cupru 0,001M.Reactivul este instabil,de aceea se va prepara o cantitate mai mică în ziua determinării.Se dizolvă 0,025 g $CuSO_4.5H_2O$ în 100 ml apă bidistilată.In 25 ml soluţie de sulfat de cupru se dizolvă 0,25 g acid ascorbic.

4.Soluţie de molibdat de amoniu 1% în acid sulfuric 0,05N.

Modul de lucru.La 0,1 ml din filtratul(supernatantul) obţinut pentru determinarea fosforului se adaugă 0,16 ml acetat de sodiu 0,25M,apoi 1,74 ml apă bidistilată,4 ml soluţie tampon 0,1M cu pH 4 şi 1 ml soluţie de acid ascorbic 1%.Se agită conţinutul eprubetelor cu atenţie.După 10 minute de repaus se introduce în fiecare eprubetă cîte un ml soluţie de molibdat de amoniu 1%.Se agită cu grijă şi se lasă în repaus 10 minute.

In paralel cu proba de cercetat şi proba martor se efectuează un control pentru reactivi,înlocuindu-se filtratul(supernatantul) şi soluţia de acetat de sodiu 0,25M cu apă bidistilată.

Intensitatea coloraţiei probelor se colorimetrează la spectrofotocolorimetrul Spekol,la lungimea de undă de 700 nm(filtru roşu),faţă de controlul reactivilor.

Pentru aflarea cantităţii de fosfor în probe se construieşte o curbă etalon,luînd între 3-30 micrograme fosfor într-un vo-

lum maxim de 2 ml soluţie etalon(Tabelul 8.5)

Tabelul 8.5.

Construirea curbei etalon pentru dozarea fosforului după Lowry şi Lopez în modificaţia lui Skulacev.

Eprubeta	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cantitatea de fosfor (micrograme)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Soluţie etalon de KH_2PO_4(ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Apă bidistilată(ml)	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Soluţie tampon de acetat(ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Soluţie acid ascorbic(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Se agită şi se lasă în repaus 10 minute											
Soluţie de molibdat (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

După 10 minute probele se fotometrează faţă de controlul reactivilor(C) la spectrofotocolorimetrul Spekol,în lungimea de undă de 700 nm(filtru roşu). Curba etalon se costruieşte trecînd pe ordonată valorile extincţiilor citite,iar pe abscisă concentraţia fosforului în probă.

Calculul rezultatelor. Extincţia probei de cercetat şi martorului se extrapolează pe curba etalon,aflîndu-se cantităţile corespunzătoare de fosfor. Pentru calcularea cantităţii de fosfor esterificat sub acţiunea α-glucanfosforilazei,din cantitatea de fosfor a martorului se scade conţinutul de fosfor în proba de cercetat.

Activitatea α-glucanfosforilazei se exprimă în micrograme de fosfor esterificat sub acţiunea enzimei dintr-un gram de material biologic :

$$\text{micrograme } P/g = (a_M - a_{cer}) \frac{10.5}{0,1.0,2} ,$$

unde : a_M -micrograme de fosfor anorganic corespunzătoare extincţiei martorului ;

a_{cer}-micrograme de fosfor anorganic rămas neesterificat în proba de cercetat.

8.4.3.DETERMINAREA ACTIVITATII FOSFOMONOESTERAZELOR

Fosfomonoesterazele sînt larg răspîndite în celulele plantelor şi animalelor,unde îndeplinesc un rol fiziologic deosebit în metabolismul substanţelor.Aceste enzime catalizează scindarea hidrolitică a monoesterilor acidului ortofosforic,între care se numără în primul rînd unii intermediari ai metabolismului glucidic: hexozomonofosfaţii(glucozo-1-fosfatul,glucozo-6-fosfatul,fructozo-6-fosfatul),hexozodifosfaţii(fructozo-1,6-difosfatul),heptozodifosfaţii(sedoheptulozo-1,7-difosfatul),etc.,precum şi monoesterii fosforici ai altor substanţe organice.

Fosfomonoesterazele sînt enzime cu o largă specificitate şi se deosebesc între ele după pH-ul optim de acţiune.Fosfomonoesteraza alcalină(fosfohidrolaza monoesterilor acidului ortofosforic, EC 3.1.3.1) sau fosfataza alcalină manifestă activitatea maximă în mediu alcalin,la un pH=8,5÷10,1.Fosfomonoesteraza acidă(fosfohidrolaza monoesterilor acidului ortofosforic,EC 3.1.3.2) sau fosfataza acidă reprezintă un amestec de trei enzime avînd optimul de acţiune la pH 4,6;3,4-4,4 şi 5,2-6,2.

Fosfomonoesteraza alcalină se întîlneşte practic în toate ţesuturile organismului animal.Cantităţi apreciabile de enzimă se găsesc în ţesutul osos,ficat,rinichi,glandele mamare,prostată, epiteliul intestinal,leucocite şi serul sanguin.Fosfomonoesteraza acidă este conţinută în seminţele plantelor,cartofi,frunzele verzi,microorganisme,precum şi în unele ţesuturi animale(splină, ficat,mai ales în prostată,în eritrocite şi în serul sanguin).

Principiul metodei.Metodele de determinare a activităţii fosfomonoesterazelor constau în evaluarea cantităţii de fosfor anorganic sau a restului organic scindat sub acţiunea acestor enzime asupra anumitor combinaţii organice ale acidului fosforic, în condiţii determinate de pH şi temperatură.Dintre combinaţiile organice ale acidului fosforic ce folosesc ca substrate pentru

determinarea activităţii fosfomonoesterazelor alcalină şi acidă se menţionează α- şi β-glicerofosfatul,fenilfosfatul,para-nitrofenilfosfatul etc.

8.4.3.1.DETERMINAREA FOSFOMONOESTERAZELOR ALCALINA SI ACIDA IN SERUL SANGUIN

METODA KING-ARMSTRONG

Principiul metodei.Fenolul eliberat din fenilfosfatul disodic sub acţiunea fosfomonoesterazelor serice este dozat colorimetric cu reactivul Folin-Ciocâlteu.

In funcţie de tamponul folosit şi pH-ul acestuia,se poate determina atît activitatea fosfomonoesterazei alcaline cît şi activitatea fosfomonoesterazei acide.

Determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline.

Reactivi.1.Soluţie tampon medinal :2,26 g medinal se dizolvă în 70 ml apă bidistilată.Se corectează pH-ul la 9 şi se completează la 100 ml cu apă bidistilată.Se păstrează la rece.

2.Soluţie de fenilfosfat disodic.Se dizolvă 0,218 g fenilfosfat disodic în 100 ml apă bidistilată,aducîndu-se la fierbere timp de cîteva minute.Se răceşte şi se păstrează la +4°C.

3.Soluţie de carbonat de sodiu anhidru 20%.

4.Soluţie stoc de fenol 0,1% în soluţie de HCl 0,1N.

5.Reactiv Folin-Ciocâlteu.Intr-un balon cu fund rotund de 500 ml,prevăzut cu refrigerent ascendent,se dizolvă 20 g wolframat de sodiu şi 5 g molibdat de sodiu în 140 ml apă distilată.Se adaugă 10 ml acid fosforic 85% şi 20 ml HCl concentrat.Amestecul se fierbe moderat,cu reflux,timp de 10 ore,apoi se adaugă 30 g sulfat de litiu şi cîteva picături de brom şi se fierbe din nou 15 minute,fără refrigerent,pentru a elimina excesul de brom.Se răceşte,se completează volumul la 200 ml cu apă distilată şi se filtrează.Reactivul nu trebuie să aibă culoarea albastră,ci galbenă.

In momentul întrebuinţării,se diluează un ml reactiv cu doi ml de apă distilată.

Modul de lucru. In două eprubete se măsoară cîte 2 ml soluţie tampon medinal şi cîte 2 ml soluţie de fenilfosfat disodic. Una din eprubete se încălzeşte 5 minute la 37°C într-o baie de apă sau termostat. In această eprubetă se adaugă 0,2 ml ser sanguin, se agită şi se lasă la 37°C exact 15 minute. După trecerea timpului de incubare, se scoate eprubeta din termostat, se adaugă 1,8 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat 1/2 şi se centrifughează sau se filtrează imediat.

Cea de a doua eprubetă se ia drept martor. Se introduc în ea 0,2 ml ser şi imediat 1,8 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat. Apoi, martorul se supune aceloraşi operaţii ca şi proba de cercetat. In filtrat(supernatant) se dozează fenolul hidrolizat.

Dozarea fenolului. In eprubete separate se iau 4 ml din filtratul probei de cercetat, 4 ml din filtratul martorului şi 2,8 ml apă distilată. In eprubeta cu apă distilată(control reactivi) se pun 1,2 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat.

In fiecare eprubetă se măsoară cîte un ml soluţie de carbonat de sodiu 20%. Se agită şi se ţin eprubetele la 37°C timp de 20 minute pentru a permite dezvoltarea culorii. Se citesc extincţiile probei de cercetat şi martorului la 700 nm faţă de controlul reactivilor(eprubeta 3).

Determinarea activităţii fosfomonoesterazei acide

Reactivi. 1. Soluţie tampon citrat-acid clorhidric cu pH 4,9. Se dizolvă 37,8 g acid citric în 300 ml apă bidistilată. Se adaugă 360 ml soluţie de NaOH 0,1N şi 200 ml soluţie de HCl 0,1N. Se ajustează pH-ul soluţiei la 4,9 folosind un pH-metru şi se completează volumul cu apă bidistilată la 1000 ml.

2. Reactivii 2-5 folosiţi la determinarea fosfomonoesterazei alcaline.

Modul de lucru. Se procedează la fel ca la determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline, cu diferenţa că hidroliza fenilfosfatului disodic sub acţiunea fosfomonoesterazei acide din ser durează 60 minute.

Dozarea fenolului se face după tehnica descrisă mai sus.

Pentru aflarea cantităţii de fenol în probe se trasează o curbă etalon, pornind de la soluţia stoc de fenol(reactiv 4) care

se diluează de 10 ori. Din această soluţie diluată (0,1 mg fenol/ml) se pipetează într-o serie de eprubete volume de la 0,1 la 1 ml corespunzînd la 0,01-0,1 mg fenol. Se completează la 2,8 ml cu apă distilată. Se adaugă cîte 1,2 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat 1/2 şi 1 ml soluţie de carbonat de sodiu 20%. Se termostatează 20 minute la 37°C şi se citesc extincţiile probelor etalon la 700 nm faţă de un control alcătuit din 2,8 ml apă distilată, 1,2 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat şi 1 ml soluţie de carbonat de sodiu.

Calculul rezultatelor. Extincţiile probei de cercetat şi martorului se raportează la curba etalon pentru a afla mg de fenol din fiecare probă. Scăzînd valoarea martorului din valoarea probei de cercetat se obţine cantitatea în mg de fenol eliberat sub acţiunea fosfomonoesterazelor.

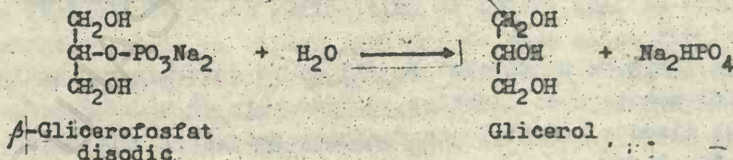
Activitatea fosfomonoesterazelor se exprimă în unităţi King-Armstrong (U.K.-A). O unitate K.-A. reprezintă cantitatea de enzimă care duce la eliberarea unui mg fenol în condiţiile de timp şi pH menţionate. Calcularea activităţii fosfomonoesterazelor în U.K.-A. pentru 100 ml ser se face după formula :

$$\text{mg fenol/100 ml} = (a_{cer} - a_M) \cdot \frac{6}{4} \cdot \frac{100}{0,2} ,$$

unde : a_{cer} -cantitatea de fenol(mg) în proba de cercetat şi
a_M -cantitatea de fenol(mg) în proba martor.

METODA BODANSKY

Principiul metodei. Fosfomonoesterazele din serul sanguin pot cataliza hidroliza β-glicerofosfatului conform următoarei reacţii:



Fosforul anorganic scindat pe calea acestei reacţii este evaluat colorimetric.

Determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline

Reactivi.1.Soluţie substrat tamponat.Se dizolvă 0,5 g β-glicerofosfat de sodiu şi 0,425 g dietilbarbiturat de sodiu(medinal) în 100 ml apă bidistilată la balon cotat.pH-ul soluţiei trebuie să fie egal cu 8,6.Se adaugă 3 ml eter de petrol sau toluen.Soluţia se păstrează în frigider.

2.Soluţie de acid tricloracetic 10%.

Modul de lucru.In două eprubete de centrifugă se măsoară cîte 2 ml soluţie substrat tamponat.Una din eprubete se introduce într-un termostat la 37°C timp de 5 minute,apoi se adaugă 0,2 ml ser şi se agită,evitîndu-se aeraţia.Amestecul obţinut se lasă în termostat la 37°C exact 60 minute(proba de cercetat).

In cealaltă eprubetă se adaugă 1,8 ml soluţie de acid tricloracetic 10% şi 0,2 ml ser(martor).Conţinutul eprubetei se agită,se lasă în repaus 10 minute şi se centrifughează.

După trecerea timpului de incubare se scoate prima eprubetă (proba de cercetat) din termostat şi se adaugă 1,8 ml soluţie de acid tricloracetic 10%,se agită bine şi se lasă în repaus 10 minute,apoi se centrifughează.

In supernatantul probei de cercetat şi martorului se dozează fosforul anorganic după metoda de mai jos.

Dozarea fosforului anorganic prin metoda Bell şi Doisy,modificată de Briggs.Principiul acestei metode se bazează pe reacţia fosforului anorganic din supernatantul deproteinizat cu molibdatul de amoniu în mediu acid,conducînd la formarea fosfomolibdatului de amoniu,care prin reducere cu hidrochinonă şi sulfit de sodiu trece în albastru de molibden.Culoarea albastră,proporţională cu cantitatea de fosfor din fosfomolibdat se determină la 600 nm sau în filtru roşu.

Reactivi.1.Soluţie de molibdat de amoniu 5%.Se dizolvă 12,5 g molibdat de amoniu în 150 ml apă distilată şi se filtrează într-un balon cotat de 250 ml.La filtrat se adaugă cu precauţie 37,5 ml acid sulfuric concentrat şi după răcire se completează la semn cu apă distilată.

2.Soluţie de sulfit de sodiu 20%.Se prepară în momentul

întrebuinţării,în cantităţi mici,pentru a evita oxidarea sulfitului sub acţiunea aerului.

3.Soluţie de hidrochinonă 1%.Se dizolvă 1 g de hidrochinonă în 100 ml apă distilată şi se adaugă 2 picături de acid sulfuric concentrat pentru conservare.Soluţia se păstrează în sticlă brună,la rece.Soluţia trebuie să fie incoloră.

4.Soluţie etalon de fosfat monopotasic.Se dizolvă 0,10985 g fosfat monopotasic în 250 ml apă distilată,la balon cotat.Această soluţie concentrată conţine 0,1 mg P/ml.Pentru prepararea soluţiei etalon se diluează 5 ml soluţie concentrată la 50 ml cu apă distilată.Soluţia diluată conţine 0,01 mg P/ml.

Modul de lucru.In eprubete separate se iau 3 ml din supernatantul probei de cercetat,3ml din supernatantul martorului şi 3 ml apă distilată.In fiecare eprubetă se măsoară cîte 1 ml soluţie de molibdat,apoi la intervale de 2 minute cîte un ml soluţie de sulfit de sodiu şi un ml soluţie de hidrochinonă.Conţinutul eprubetelor se agită energic şi se lasă în repaus.

După 30 minute se citesc extincţiile probei de cercetat şi a martorului,la 600 nm(filtru roşu),faţă de proba cu apă distilată.

Pentru aflarea cantităţii de fosfor în probe se trasează o curbă de etalonare,pipetînd într-o serie de eprubete volume din soluţia etalon de fosfat monopotasic(0,01 mgP/ml) cuprinse între 0,1-3,0 ml corespunzînd la 0,001-0,03 mg fosfor.Se completează la 3 ml cu apă distilată.Apoi se adaugă cîte 1 ml soluţie de molibdat de amoniu şi la intervale de 2 minute,un ml soluţie de sulfit de sodiu şi un ml soluţie hidrochinonă.Probele se agită energic şi după 30 minute se colorimetrează la 600 nm(filtru roşu) faţă de un control conţinînd 3 ml apă distilată şi reactivii de culoare.

Calculul rezultatelor.Se determină cantitatea de fosfor în proba de cercetat şi în martor,raportînd extincţiile la curba etalon.Din valoarea conţinutului de fosfor în proba de cercetat se scade valoarea găsită la martor.

Activitatea fosfomonoesterazei alcaline se exprimă în unităţi Bodansky.O unitate Bodansky(U.B.) corespunde unei activi-

tăţi enzimatice care duce la eliberarea de un mg fosfat anorganic în timp de 60 minute la 37°C.In calcul se va ţine seama de cantitatea de ser luată în lucru şi de faptul că activitatea fosfomonoesterazei alcaline se raportează la 100 ml ser.In consecinţă, calcularea activităţii enzimei se efectuează după formula :

$$mg\ P/100\ ml = (a_{cer} - a_M) \cdot \frac{4}{3} \cdot \frac{100}{0,2},$$

în care : a_{cer} -cantitatea de fosfor(mg) în proba de cercetat ;
a_M -cantitatea de fosfor(mg) în martor.

Observaţii.Serul sanguin în care se determină activitatea fosfomonoesterazelor alcalină şi acidă trebuie să fie proaspăt şi nehemolizat.Analiza trebuie efectuată nu mai tîrziu de 24 ore. Cînd sîngele trebuie transportat,se va menţine pe gheaţă.

Dacă activitatea fosfomonoesterazică este foarte ridicată,se repetă determinarea cu o cantitate mai mică de ser sau cu ser diluat în soluţie de NaCl 0,9%.

Dacă activitatea fosfomonoesterazică este mică,se repetă determinarea incubînd 2 sau 3 ore.In aceste cazuri,rezultatele obţinute se corectează înmulţind cu 0,55 şi respectiv 0,39.

Variaţii fiziopatologice.In condiţii normale activitatea fosfomonoesterazei alcaline variază cu vîrsta.

adulţi : 4-12 unităţi K.-A.
2-6 unităţi Bodansky
copii : 6-20 unităţi K.-A.
6-16 unităţi Bodansky.

Activitatea fosfomonoesterazei acide în serul sanguin poate fi cuprinsă între limitele :1-3 unităţi K.-A. şi între 0,1-0,9 unităţi Bodansky.

In unele stări fiziologice se observă o creştere a activităţii fosfomonoesterazei alcaline.Astfel,această enzimă este deosebit de activă spre sfîrşitul sarcinii şi în cursul perioadei de alăptare la femei,iar la copil în cursul perioadei de osificare intensă(creşterea scheletului).

In diferite stări patologice se evidenţiază o creştere pronunţată a activităţii celor două fosfomonoesteraze,determinarea lor avînd o deosebită însemnătate clinico-diagnostică.

Creşterea activităţii fosfomonoesterazei alcaline se întîlneşte preponderent în două stări patologice : bolile oaselor legate cu proliferarea osteoblastelor(rahitism,boala lui Paget,hiperparatiroidism,sarcomul oaselor etc.) şi în cazul bolilor ficatului,însoţite de fenomene de colestază.O creştere a activităţii fosfomonoesterazei alcaline se constată,de asemenea în bolile muşchiului şi în leucemii.

Activitatea fosfomonoesterazei acide înregistrează valori ridicate în cancerul prostatei şi în unele neoplasme ale glandei mamare.

8.4.3.2.<u>DETERMINAREA ACTIVITATII FOSFOMONOESTERAZEI ACIDE IN PLANTE</u>

<u>Principiul metodei</u> de determinare a activităţii fosfomonoesterazei acide în plante este asemănător cu cel descris la determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline prin metoda Bodansky.In cazul fosfomonoesterazei acide se foloseşte o soluţie tampon cu pH-ul în domeniu acid.

<u>Reactivi</u>.1.Soluţie de clorură de sodiu 0,9%.

2.Soluţie tampon acid citric-citrat de sodiu M/10 cu pH 6,2. Se dizolvă 1,5130 g acid citric($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) şi 15,2864 g citrat de sodiu($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5^{1}/2H_2O$) în 500 ml apă bidistilată.

3.Soluţie de β-glicerofosfat de sodiu 1,5% în soluţie tampon citrat M/10 cu pH 6,2.

4.Soluţie de acid tricloracetic 10%.

<u>Modul de lucru</u>.<u>Extragerea fosfomonoesterazei acide</u>.O cantitate de 1 g material vegetal(seminţe de bob,mazăre,grîu,porumb etc.) fin omogenizat se extrage cu 5 ml soluţie de NaCl 0,9%, timp de 60 minute,la temperatura camerei,prin agitare cu intermitenţă(10 minute repaus şi un minut agitare).Apoi amestecul se supune centrifugării timp de 15 minute la 3000 rot./min.Supernatantul obţinut se foloseşte drept sursă de enzimă(extract enzimatic).

<u>Determinarea activităţii enzimei</u>.In două eprubete de centrifugă se măsoară cîte 1 ml soluţie de glicerofosfat de sodiu.

In prima eprubetă(proba de cercetat) se adaugă 0,5-1 ml extract enzimatic şi se completează volumul la 2 ml cu soluţie de NaCl 0,9%. Conţinutul eprubetei se agită şi se termostatează la $30^{o}C$ pentru 30 minute.

După incubare se introduc în fiecare eprubetă cîte 3 ml soluţie de acid tricloracetic 10%. In eprubeta a doua(martor) se pipetează exact aceleaşi volume de extract enzimatic şi de soluţie de NaCl care au fost adăugate în proba de cercetat. Conţinutul eprubetelor se agită şi se centrifughează.

In supernatantele obţinute se determină cantitatea de fosfor anorganic.

<u>Dozarea fosforului anorganic</u> în proba de cercetat şi martor se realizează după procedeul descris la pag.107, luînd cîte 0,5-3 ml supernatant limpede, în funcţie de cantitatea presupusă de fosfor eliberat care este dependentă de activitatea enzimei.

<u>Calculul rezultatelor</u>. Activitatea fosfomonoesterazei acide se exprimă în mg de P eliberat de enzima dintr-un gram de material vegetal cercetat în condiţiile experimentale descrise :

$$\text{mg P/1 g} = (a_{cer} - a_m) \cdot \frac{5}{v} \cdot \frac{5}{n} ,$$

unde : a_{cer} -cantitatea de fosfor(mg) corespunzătoare extincţiei probei de cercetat ;

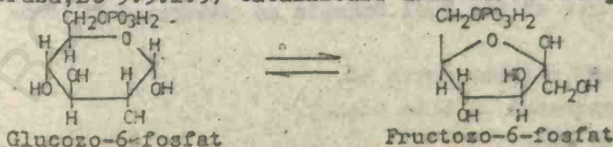
a_m -cantitatea de fosfor(mg) corespunzătoare extincţiei martorului ;

v -volumul(ml) de supernatant luat pentru dozarea fosforului anorganic şi

n -volumul(ml) de extract enzimatic adăugat în probe.

8.4.4. DETERMINAREA ACTIVITATII GLUCOZOFOSFATIZOMERAZEI

Enzima glucozofosfatizomeraza(D-glucozo-6-fosfat-cetol-izomeraza, EC 5.3.1.9) catalizează următoarea reacţie reversibilă :



Enzima este larg răspîndită în ţesuturile organismului animal şi în plante, unde participă în procesele de glicoliză anaerobă, ciclul pentozofosfaţilor etc.

Determinarea activităţii glucozofosfatizomerazei în serul sanguin prin metoda Bodansky cu unele modificaţii ale lui Korovkin.

Principiul metodei. Glucozofosfaţizomeraza din serul sanguin transformă parţial glucozo-6-fosfatul în fructozo-6-fosfat. Ultimul formează cu HCl concentrat hidroximetilfurfurolul, care reacţionează cu rezorcina dînd o culoare roşie. Intensitatea culorii este proporţională cu concentraţia fructozo-6-fosfatului, prin urmare şi cu activitatea enzimei.

Reactivi. 1. Soluţie de glucozo-6-fosfat de sodiu 0,03M. La 391 mg glucozo-6-fosfat de bariu se adaugă 2 ml de apă bidistilată. Suspensia formată se dizolvă prin adăugarea cu picătura a unei soluţii de HCl concentrat. Apoi la soluţia obţinută se adaugă cu picătura soluţie de sulfat de sodiu 10%. Se aşteaptă cîteva minute pînă se depune precipitatul de sulfat de bariu şi se verifică precipitarea completă a ionilor de bariu pe calea adăugării unei picături de sulfat de sodiu. In cazul apariţiei unei opalescenţe, se mai adaugă sulfat de sodiu. Dacă precipitarea s-a realizat complet, amestecul se centrifughează şi supernatantul se transvazează într-un balon cotat de 25 ml, se aduce pH-ul la 7,4 cu soluţie de NaOH 1N şi se completează la semn cu apă bidistilată. Se obţine o soluţie de glucozo-6-fosfat 0,03M.

2. Soluţie tampon medinal-acetat. Se dizolvă 2,9428 g dietilbarbiturat de sodiu (medinal) şi 1,9428 g acetat de sodiu în 100 ml apă bidistilată.

3. Soluţie substrat tamponat. Se amestecă 8,33 ml soluţie de glucozo-6-fosfat de sodiu 0,03M, 25 ml soluţie tampon medinal-acetat, 25 ml soluţie de HCl 0,1N şi se completează cu apă la 100 ml (pH-ul soluţiei trebuie să fie 7,4). Soluţia se păstrează în frigider.

4. Soluţie de acid tricloracetic 5%.

5. Soluţie de rezorcină 0,1% în etanol.

6. Soluţie de HCl 10N.

Modul de lucru. Intr-o eprubetă se măsoară 0,5 ml ser diluat cu apă 1:2 şi 1 ml soluţie substrat tamponat(reactiv 3). Amestecul se agită şi se incubează în termostat la 37°C timp de 30 minute. După incubare se adaugă 2,5 ml soluţie acid tricloracetic 5%, se agită şi se centrifughează.

In paralel se efectuează o probă martor, în care se pipetează 0,5 ml ser diluat cu apă 1 : 2, imediat 2,5 ml soluţie de acid tricloracetic şi apoi 1 ml soluţie substrat tamponat. Se agită şi se centrifughează.

In eprubete separate se iau cîte 2 ml supernatant corespunzător probei de cercetat(eprubeta incubată) şi martorului, se adaugă 2 ml soluţie de rezorcină 0,1% şi 6 ml soluţie de HCl 10N. Conţinutul eprubetelor se agită şi se încălzeşte pe baia de apă la 80°(±1°) timp de 15 minute. Soluţiile se colorează în viginiu-roz. Intensitatea coloraţiei se determină cu ajutorul unui fotoelectrocolorimetru, la 508 nm, faţă de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Diferenţa între extincţiile probei de cercetat şi martorului este proporţională cu activitatea enzimei. Activitatea glucozofosfatizomerazei se exprimă în micromoli de fructozo-6-fosfat care se formează sub acţiunea enzimei din un ml ser, în timp de 60 minute, la 37°C.

Pentru aflarea cantităţii de fructozo-6-fosfat în probe se construieşte o curbă etalon. In calitate de substanţă etalon se poate folosi fructoza liberă sau sarea de sodiu a fructozo-6-fosfatului. Trebuie reţinut că fructozo-6-fosfatul dă o coloraţie mai slabă decît fructoza liberă cu rezorcina. Astfel, cu fructozo-6-fosfat intensitatea culorii reprezintă numai 62% din intensitatea culorii fructozei libere, raportată la un mol de substanţă, fapt de care trebuie ţinut seama la efectuarea calculelor. In tabelul 8.6 se dă schema de alcătuire a unei serii de probe etalon cu soluţie de fructoză(100 micrograme într-un ml soluţie de HCl 1N)

Tabelul 8.6.

Schema alcătuirii seriei etalon pentru fructoză

Nr. probei	Fructoză (micrograme)	Soluţie etalon de fructoză (ml)	Soluţie de HCl 1N(ml)	Soluţie de rezorcină 0,1%(ml)	Soluţie de HCl 10N(ml)
1	10	0,10	1,90	2	6
2	15	0,15	1,85	2	6
3	25	0,25	1,75	2	6
4	50	0,50	1,50	2	6
5	75	0,75	1,25	2	6
C	0	-	2,00	2	6

Conţinutul eprubetelor se agită şi se introduc într-o baie de apă la 80° pentru 15 minute. Apoi probele se colorimetrează faţă de controlul reactivilor(C).

Folosindu-se curba etalon construită în modul indicat, activitatea glucozofosfatizomerazei se poate calcula după formula :

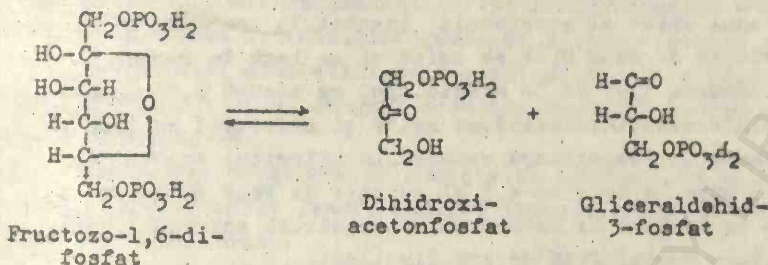
$$\frac{\text{micromoli fructozo-6-fosfat}}{\text{1 ml x 60 minute la } 37^{\circ}\text{C}} = \frac{a.24.1.6}{261},$$

unde: a -cantitatea de fructoză(micrograme) citită pe curba etalon;
24-coeficient de calcul pentru 1 ml ser şi 60 minute de incubaţie ;
1,6-coeficient de conversie a fructozei în fructozo-6-fosfat;
261-masa în micrograme a unui micromol de fructozo-6-fosfat.

Valori normale. În condiţii normale activitatea glucozofosfatizomerazei este de 2 micromoli fructozo-6-fosfat la un ml ser pentru 60 minute de incubaţie la 37°C.

8.4.5. DETERMINAREA ACTIVITATII FRUCTOZODIFOSFATALDOLAZEI

Fructozodifosfataldolaza(fructozo-1,6-difosfat-D-gliceraldehid-3-fosfatliaza, EC 4.1.2.1 3) catalizează scindarea reversibilă a fructozo-1,6-difosfatului în doi triozo-fosfaţi, gliceraldehid-3-fosfat şi dihidroxiacetonfosfat:



Fructozodifosfataldolaza este prezentă în microorganisme,în țesuturile animale și plante,fiind o enzimă importantă a căii glicolitice,ciclului pentozofosforic și ciclului Calvin-Bassham.

Metoda colorimetrică de determinare a activității fructozodifosfataldolazei în serul sanguin(Metoda Kulganek și Klaska)

Principiul metodei.Fructozodifosfataldolaza scindează fructozo-1,6-difosfatul în gliceraldehid-3-fosfat și dihidroxiacetonfosfat.Reacția are loc în prezența hidrazinclorhidratului care leagă triozofosfații rezultați asigurînd desfășurarea reacției într-un singur sens.Prin hidroliză alcalină se eliberează triozele care formează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina fenilhidrazonele corespunzătoare colorate în maro.Intensitatea culorii este proporțională cu activitatea enzimei.

Reactivi.1.Soluție de fructozo-1,6-difosfat 0,005M în soluție de hidrazină 0,056M(pH 8,2).Se dizolvă 250 mg fructozodifosfat de bariu în 70 ml apă bidistilată,se adaugă 410 mg clorhidrat de hidrazină și se ajustează pH-ul la 8,2 cu ajutorul unei soluții de KOH 1N.Volumul amestecului se completează la 100 ml cu apă bidistilată.

2.Soluție de HCl 2N.

3.Soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,6N.Se dizolvă 100mg dinitrofenilhidrazină în 100 ml soluție de HCl 2N.

4.Soluție de NaOH 0,6N.

Modul de lucru. La 0,1 ml ser se adaugă 0,5 ml soluție de fructozodifosfat în hidrazină și se incubează 30 minute la 37°C. Reacția se oprește prin adăugarea a 0,1 ml soluție de HCl 2N.

Proteinele nu se îndepărtează şi pentru reacţia de culoare se foloseşte întregul volum al amestecului incubat.In probă se măsoară 0,5 ml soluţie de NaOH 0,6N,se agită şi se lasă în repaus la temperatura camerei timp de 30 minute.Apoi se adaugă 1,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină,se agită şi amestecul se lasă în repaus 30 minute la temperatura camerei.La sfîrşitul acestei perioade se introduc în amestec 4,5 ml soluţie de NaOH 0,6N.După agitare,proba se menţine la întuneric 20 minute.Se colorimetrează la 536 nm(filtru verde) faţă de apă distilată.

In paralel cu proba de cercetat se realizează un <u>martor</u> în care soluţia de fructozo-1,6-difosfat în hidrazină se introduce după adăugarea soluţiei de HCl 2N.Mai departe se procedează în acelaşi mod ca şi la proba de cercetat.

<u>Calculul rezultatelor</u>.Diferenţa între extincţia probei(E_{cer}) şi extincţia martorului(E_m) este proporţională cu activitatea enzimei.Activitatea fructozodifosfataldolazică se exprimă în micromoli fructozodifosfat scindat de enzima dintr-un ml ser în decurs de 60 minute.Pentru construirea curbei etalon se foloseşte dihidroxiacetona.In lipsa acestei cetotrioze ,activitatea fructozodifosfataldolazei se poate exprima în unităţi convenţionale de extincţie:

$$(E_{cer}-E_m).100$$

<u>Variaţii fiziopatologice</u>.Valoarea normală a activităţii fructozodifosfataldolazei în serul sanguin nu depăşeşte 3-8 unităţi convenţionale.

Conţinutul acestei enzime în serul sanguin creşte puternic în hepatita acută,distrofia musculară progresivă(miopatie),infarct miocardic,pancreatită acută hemoragică,anemie hemolitică severă etc.

8.4.6.<u>DETERMINAREA ACTIVITATII LACTATDEHIDROGENAZEI</u>

Lactatdehidrogenaza(L-lactat:NAD-oxidoreductaza,EC 1.1.1.27) catalizează următoarea reacţie :



$$CH_3COCOOH + NAD.H_2 \rightleftharpoons CH_3CHOHCOOH + NAD$$

Enzimă glicolitică,lactatdehidrogenaza se întîlneşte în majoritatea organelor şi ţesuturilor de origine animală şi vegetală,

de asemenea,în microorganisme.In cazul organismului uman cea mai mare activitate lactatdehidrogenazică posedă rinichii,mușchiul cardiac,mușchii scheletici,pancreasul,splina,ficatul,plămînii,serul sanguin.In serul sanguin s-au descoperit 5 izoenzime ale lactatdehidrogenazei.

Lactatdehidrogenaza se găsește,de asemenea,în eritrocite,de aceea serul folosit pentru analiză trebuie să fie proaspăt și fără urme de hemoliză.

Cercetarea activității totale a lactatdehidrogenazei contribuie la cunoașterea intensității proceselor oxido-reducătoare din organismul animal,iar determinarea activității izoenzimelor lactatdehidrogenazei facilitează stabilirea diagnosticului în unele boli ale inimii,ficatului și altor organe.

Pentru determinarea activității lactatdehidrogenazei se utilizează metode colorimetrice și spectrofotometrice.

Metoda colorimetrică de determinare a activității lactatdehidrogenazei în serul sanguin(Metoda Sevela și Tovarek în modificația lui Korovkin)

Principiul metodei.Acidul L-lactic în mediu alcalin sub acțiunea lactatdehidrogenazei din serul sanguin și a NAD exogen se oxidează în acid piruvic.După cantitatea de piruvat,care se dozează cu ajutorul 2,4-dinitrofenilhidrazinei,se apreciază activitatea enzimei.

Reactivi.1.Soluție de lactat de sodiu 0,45M.Intr-un balon cotat de 100 ml se introduc 5 ml acid lactic 80%(sau 10 ml 40%) și se neutralizează cu soluție de NaOH 2N pînă la pH 7,5.Volumul se completează la 100 ml cu apă bidistilată.

2.Soluție de pirofosfat de sodiu 0,03M(pH 8,8).Se dizolvă 6,69 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ în 50 ml apă.Se stabilește pH-ul la 8,8 cu ajutorul unei soluții de HCl 1N și se completează volumul la 500 ml cu apă bidistilată.Reactivul este stabil în decurs de o lună dacă se păstrează la frigider.

3.Soluție de NAD.Se dizolvă 3 mg NAD într-un ml de apă bidistilată.Reactivul este stabil timp de 4 săptămîni,prin păstrare în frigider.

Soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină. Se dizolvă 19,8 mg 2,4-dinitrofenilhidrazină în 100 ml soluţie HCl 1N.

5. Soluţie de NaOH 0,4N.

6. Soluţie de HCl 1N.

7. Soluţie etalon de piruvat de sodiu. Se dizolvă 12,5 mg piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată.

Modul de lucru. In două eprubete se măsoară cîte 0,3 ml soluţie de NAD. In prima eprubetă (proba de cercetat) se adaugă 0,1 ml ser sanguin diluat cu apă bidistilată (1:2).

Intr-o a treia eprubetă se toarnă 4 ml soluţie de pirofosfat de sodiu şi 1 ml soluţie de lactat de sodiu.

Toate cele trei eprubete se incubează într-o baie de apă la 37°C timp de 5 minute. Apoi în proba de cercetat şi în eprubeta a doua (martor) se pipetează cîte 1 ml amestec din eprubeta a treia. Conţinutul primelor două eprubete (probă şi martor) se agită şi se incubează la 37°C în decurs de 15 minute.

După incubaţie, în proba de cercetat şi martor se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazina. In martor se adaugă 0,1 ml ser diluat (1:2). Se agită şi se lasă la temperatura camerei timp de 20 minute. Apoi se introduc cîte 5 ml soluţie de NaOH 0,4N. Conţinutul eprubetelor se agită şi peste 10-15 minute se fotometrează faţă de apă, la 536 nm (filtru verde).

Calculul rezultatelor. Calculul activităţii lactatdehidrogenazei se efectuează după curba etalon construită cu piruvat de sodiu (tabelul 8.7.)

Tabelul 8.7.

Schema construirii curbei de etalonare

Nr. probei	Acid piruvic (micrograme)	Soluţie de piruvat de sodiu (ml)	Apă distilată (ml)	Soluţie de pirofosfat de sodiu (ml)
1	5	0,05	0,55	0,8
2	10	0,10	0,50	0,8
3	15	0,15	0,45	0,8
4	20	0,20	0,40	0,8
5	25	0,25	0,35	0,8
6	30	0,30	0,30	0,8

In fiecare eşantion se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină.Mai departe probele etalon se tratează în mod similar cu proba de cercetat şi martorul.

Diferenţa între extincţia probei de cercetat(E_{cer}) şi extincţia martorului(E_m) arată cantitatea de acid piruvic format în timpul incubaţiei sub acţiunea lactatdehidrogenazei.Activitatea lactatdehidrogenazei se exprimă în micromoli de acid piruvic rezultaţi prin incubaţia unui ml de ser,timp de 60 minute la 37°C.

Folosind curba etalon,activitatea lactatdehidrogenazei se poate calcula după formula :

$$\frac{\text{micromoli acid piruvic}}{\text{ml x 60 minute}} = (a_{cer}-a_m)\frac{3}{0,1}\cdot\frac{60}{15}\cdot\frac{1}{88},$$

unde: a_{cer} -cantitatea de acid piruvic(micrograme) în proba de cercetat ;

a_m -cantitatea de acid piruvic(micrograme) în martor ;

88 -masa unui micromol de acid piruvic în micrograme ;

Valorile normale ale activităţii lactatdehidrogenazei în serul sanguin sînt cuprinse între 0,4-4 micromoli acid piruvic la un ml de ser pentru 60 minute incubaţie la 37°C.

Determinarea activităţii fracţiunii lactatdehidrogenazice serice stabilă la uree.

In serul sanguin s-au evidenţiat 5 izoenzime ale lactatdehidrogenazei(LDH) : LDH_1,LDH_2,LDH_3,LDH_4 şi LDH_5,care migrează în gel în ordinea scăderii mobilităţii lor electroforetice.S-a stabilit că fracţiunea LDH_1 provine, în principal din inimă,iar LDH_5 din ficat.Spre deosebire de LDH_5,prima izoenzimă LDH_1 posedă stabilitate la acţiunea denaturantă a ureei.

Prin metoda descrisă mai sus se poate determina,de asemenea, activitatea fracţiunii lactatdehidrogenazei din serul sanguin stabilă la acţiunea ureei.

Principiul metodei se bazează pe proprietatea ureei de a inhiba 100% activitatea LDH_5.Determinarea paralelă a activităţii globale a LDH şi activităţii fracţiunii LDH neinfluenţabilă de către uree,permite calcularea procentului fracţiunii stabile la

acţiunea ureei.

Reactivi.1.Soluţie de uree în soluţie de pirofosfat de sodiu.Se dizolvă 14,4 g uree în 100 ml pirofosfat de sodiu 0,03M cu pH 8,8.

2.Reactivii 1-7 din metoda precedentă(pag.117).

Modul de lucru.Se amestecă 0,1 ml ser diluat(1 : 2) cu 0,8ml soluţie de uree în soluţie de pirofosfat de sodiu 0,03M şi cu 0,3 ml soluţie de NAD.Eprubeta se închide cu dop şi se preincubează timp de 60 minute la 25°C.Apoi în eprubetă se adaugă 0,2ml soluţie de lactat de sodiu 0,45M,se agită şi se incubează 15 minute la 37°C.

In paralel se determină activitatea globală a LDH,fără încălzirea prealabilă a reactivilor la temperatura de 37°C.După realizarea amestecului de incubaţie cu reactivii avînd temperatura camerei,se incubează imediat timp de 15 minute la 37°C.

După incubaţie cele două procedee nu se deosebesc de metoda descrisă mai sus.

Calculul rezultatelor.Se calculează procentul LDH stabilă la acţiunea ureei,în raport cu activitatea globală a LDH.

Conform datelor din literatură fracţiunea LDH stabilă la uree reprezintă 25-36% din activitatea globală a LDH.

In bolile ficatului fracţiunea stabilă la uree scade(< 20%), iar în infarctul miocardic creşte(> 40%).

Metoda spectrofotometrică de determinare a activităţii lactatdehidrogenazei în serul sanguin(Metoda Wroblewski şi La Due,modificată de Hill).

Principiul metodei.Se bazează pe măsurarea vitezei de oxidare a NAD.H_2 în timpul reacţiei de transformare a acidului piruvic în acid lactic.Viteza de oxidare a NAD.H_2 se estimează după scăderea extincţiei la 340 nm.

Reactivi.1.Soluţie de piruvat de sodiu 0,01M.Se dizolvă 1,1 mg piruvat de sodiu într-un ml soluţie tampon de fosfaţi 0,1M cu pH 7,8.

2.Soluţie de $NAD.H_2$ 0,001%.Inainte de întrebuinţare,se dizolvă 3 mg $NAD.H_2$ în 3 ml de apă bidistilată.

3.Soluţie de carbonat de sodiu 1%.

4.Soluţie tampon de fosfaţi 0,1M cu pH 7,8.

5.Amestec de soluţie tampon şi substrate.In momentul utilizării se prepară amestecul alcătuit din 1 ml soluţie de piruvat de sodiu,25 ml soluţie tampon fosfat,1 ml soluţie de carbonat de sodiu şi 3 ml soluţie de $NAD.H_2$.Amestecul se agită.

Modul de lucru.Se măsoară cîte 2,9 ml amestec soluţie tampon-substrate în 2 eprubete şi se încălzesc într-o baie de apă pînă la 37°C.Apoi într-o eprubetă(proba de cercetat) se adaugă repede 0,1 ml ser sanguin diluat cu apă bidistilată(0,1 ml ser+0,9 ml apă).Conţinutul eprubetei se agită şi se transvazează în cuva spectrofotometrului.Grosimea cuvei -1cm.Măsurarea se face faţă de un control alcătuit din 2,9 ml amestec tampon-substrate(eprubeta a doua) şi 0,1 ml apă bidistilată,la 340 nm.Se citeşte valoarea extincţiei -E_1.Apoi proba de cercetat se incubează 30 minute într-o baie de apă la 37°C.Se măsoară a doua extincţie -E_2.

Calculul rezultatelor.Activitatea enzimei se exprimă în milimicromoli de substrat transformat de un ml ser în timp de 1 minut.Calculul se realizează prin formula :

$$\frac{\text{Milimicromoli piruvat}}{1\ \text{ml} \times 1\ \text{minut}} = \frac{\Delta E.100.1000}{30 \times 2,07},$$

unde: $\Delta E = E_1 - E_2$

30-timpul de incubaţie,în minute ;

100-gradul de diluţie a serului ;

2,07-coeficientul de extincţie la 340 nm pentru 1 micromol $NAD.H_2$ conţinut în 3 ml soluţie;

1000-transformarea în milimicromoli.

8.4.7. DETERMINAREA ACTIVITATII UNOR DEHIDROGENAZE PARTICIPANTE LA DEHIDROGENAREA PRIMARA A SUBSTRATELOR

Dehidrogenazele-enzime din clasa oxidoreductazelor catalizează scindarea hidrogenului de la substrat(dehidrogenare),efectuînd astfel oxidarea lui.Schema generală de acţiune a dehidrogenazelor este următoarea :



$$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2 ,$$

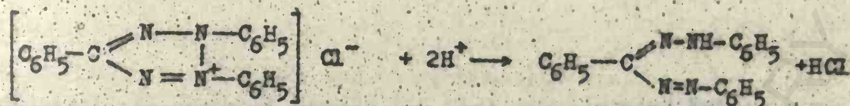
unde: AH_2 -substratul supus dehidrogenării ;
A -substratul oxidat ;
B -acceptor de hidrogen.

Se cunosc dehidrogenaze anaerobe(dehidrogenaze primare)care transferă hidrogenul la acceptori intermediari şi dehidrogenaze aerobe capabile să transporte hidrogenul de la substratul supus oxidării direct la oxigenul atmosferic.

Coenzimele dehidrogenazelor anaerobe pot fi NAD şi NADP sau FMN şi/FAD.In funcţie de natura chimică a substratului care donează hidrogenul,dehidrogenazele poartă denumirile corespunzătoare : izocitratdehidrogenază, α-cetoglutaratdehidrogenază, succinatdehidrogenază,malatdehidrogenază etc.Aceste enzime sînt larg răspîndite în ţesuturile animale şi vegetale,unde catalizează etapa de început a oxidării biologice, etapă reprezentată prin ciclul acizilor tricarboxilici şi procesele de oxidare a acizilor graşi.Pentru determinarea activităţii dehidrogenazelor s-au elaborat diferite metode.

Determinarea activităţii dehidrogenazelor în biomasa microorganismelor(Metoda Sîsoev şi Krasna,modificată parţial de Artenie).

Principiul metodei.La baza metodei se află capacitatea dehidrogenazelor de a transfera hidrogenul de la diferite substrate (acizi carboxilici,alcooli,glucide etc) la clorura de 2,3,5-trifeniltetrazoliu(CTT) care se reduce şi trece în trifenilformazan colorat în roşu :



Intensitatea culorii trifenilformazanului format este proporţională cu activitatea dehidrogenazelor.

Reactivi. 1. Soluţie tampon de fosfat cu pH 7,4. Intr-un balon cotat de 50 ml se dizolvă 4g K_2HPO_4 în 30 ml apă distilată, apoi se adaugă 0,2 g gelatină şi după dizolvare se aduce pH-ul la 7,4 cu o soluţie de KOH 1N. Se completează volumul la 50 ml cu apă distilată (Soluţia A). Se dizolvă 0,4 g $MgCl_2.6H_2O$ în 30 ml apă distilată, se corectează pH-ul la 7,4 şi se completează la 50 ml cu apă distilată (Soluţia B). In momentul întrebuinţării se amestecă un volum de soluţie A cu un volum egal de soluţie B.

2. Soluţie de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu 1%.

3. Soluţie de substrat de lucru. In calitate de donor de hidrogen pentru dehidrogenaze se folosesc soluţii 0,2M de acid izocitric, acid α-cetoglutaric, acid succinic, acid malic, glucoză. In cazul soluţiilor de acizi carboxilici pH-ul se ajustează cu soluţie de KOH la 7,4. Inainte de determinare, se amestecă volume egale din soluţiile de substrate şi soluţia de clorură de trifeniltetrazoliu 1%.

4. Dizolvant pentru trifenilformazan. Se amestecă 95 ml alcool etilic 96% cu 5 ml acid acetic 98%.

5. Soluţie de acid ascorbic 5% cu pH 8,8 pentru reducerea CTT. Se prepară extemporaneu dizolvînd 0,5 g acid ascorbic în 10 ml soluţie de K_2HPO_4 2%, conţinînd 0,1% gelatină şi 0,2% $MgCl_2 6H_2O$. Se corectează pH-ul amestecului la 8,8 cu soluţie de KOH 2N.

6. Soluţie stoc de clorură de trifeniltetrazoliu. Se dizolvă 87,5 mg CTT în 100 ml apă distilată.

Modul de lucru. Biomasa microbiană separată prin centrifugare se introduce în congelatorul unui frigider şi se lasă circa o oră pentru îngheţare completă. Se cîntăreşte repede 1 g de biomasă congelată şi se mojarează cu 0,5 g sticlă pisată. După 5 minute de mojarare se adaugă 2-5 ml tampon fosfat cu pH 7,4 (reactiv 1),

se continuă omogenizarea încă 2-3 minute și suspensia obținută se transvazează într-o eprubetă aflată într-o baie de apă cu gheață. Operația de triturare se execută într-un mojar menținut pe gheață.

In două eprubete notate cu probă de cercetat și martor se introduce cîte 1 ml din suspensia de biomasă. In proba de cercetat se adaugă 0,2 ml soluție substrat de lucru, iar în martor 0,2 ml soluție tampon fosfat(reactiv 1). Eprubetele se introduc într-un termostat cu temperatura de 28°C și se lasă timp de 3-18 ore, în funcție de activitatea dehidrogenazică presupusă.

La sfîrșitul incubației, se măsoară în fiecare eprubetă cîte 5 ml dizolvant(reactiv 4) pentru extragerea trifenilformazanului format. Conținutul eprubetelor se agită cu atenție de mai multe ori în decurs de 3-6 ore. Apoi soluțiile se filtrează, pe hîrtie de filtru cantitativă pentru precipitate fine, în eprubete uscate. Se citește extincția soluțiilor probei de cercetat și martorului la 540 nm(filtru verde) față de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Activitatea dehidrogenazelor se exprimă în micrograme de clorură de trifeniltetrazoliu redusă(trifenilformazan format) sub acțiunea enzimei dintr-un gram de biomasă umedă sau uscată.

Pentru calcularea activității dehidrogenazelor se realizează o curbă etalon cu soluție etalon de clorură de trifeniltetrazoliu. In 7 eprubete se introduce cîte 1 ml soluție de acid ascorbic 5% (reactiv 5) și se adaugă cîte 0,2 ml soluție etalon de clorură de trifeniltetrazoliu conținînd de la 0,025 pînă la 0,175 mg substanță. Conținutul eprubetelor se încălzește la fierbere, după care se mențin la întuneric timp de 20 minute. In fiecare eprubetă se pipetează cîte 5 ml dizolvant(reactiv 4). Extragerea trifenilformazanului se efectuează prin agitare cu intermitență în decurs de 3-6 ore. Apoi soluțiile se filtrează în eprubete uscate și se determină extincțiile probelor la 540 nm(filtru verde). Cu datele obținute se trasează curba etalon trecînd pe abscisă micrograme de clorură de trifeniltetrazoliu în probă, iar pe ordonată extincția probelor etalon.

8.4.8. DETERMINAREA ACTIVITATII UNOR ENZIME DIN ETAPELE TERMINALE ALE OXIDARII BIOLOGICE.

Etapele terminale ale oxidării biologice, însoţite de eliberarea de energie, care se acumulează în legăturile macroergice ale acidului adenozintrifosforic (ATP), sînt legate cu transferul protonilor şi electronilor prin lanţul respirator la oxigenul molecular.

Spectrul enzimelor corelate cu realizarea etapelor terminale ale oxidării biologice la diferite organisme vii este deosebit de complex, una şi aceeaşi funcţie fiind efectuată de mai multe enzime, deosebite structural şi din punct de vedere al mecanismului lor de acţiune.

Multitudinea sistemelor enzimatice, întîlnite în organismele vii, limitează posibilitatea descrierii metodelor pentru determinarea activităţii tuturor enzimelor răspunzătoare de reacţiile oxidării biologice. De aceea se vor descrie numai metodele de determinare, dacă nu întotdeauna a celor mai importante, barem a celor mai răspîndite şi accesibile (sub aspect metodologic şi material) enzime din etapele terminale ale oxidării biologice.

8.4.8.1. DETERMINAREA ACTIVITATII CITOCROMOXIDAZEI

Citocromoxidaza (citocrom c: oxigen-oxidoreductaza, EC 1.9.3.1), component terminal al lanţului respirator reprezintă enzima principală a oxidării biologice. Ea este localizată preponderent în mitocondriile celulelor animale şi vegetale. Ca grupare prostetică citocromoxidaza conţine o feriporfirină. In prezent există date care dovedesc că în preparatele de citocromoxidază se găseşte pe lîngă ferul porfirinic şi cupru. Se presupune că funcţia cuprului este corelată cu sinteza hemului. Citocromoxidaza catalizează oxidarea citocromilor reduşi, proprietate bazată pe capacitatea ferului de a se oxida şi reduce reversibil, acceptînd şi donînd electroni.

Donorul de electroni pentru citocromoxidază este citocromul c. Măsurarea vitezei de oxidare a citocromului c sub acţiunea

citocromoxidazei se află la baza metodei de determinare a activității acestei enzime.

Forma redusă a citocromului c spre deosebire de cea oxidată are maximul de absorbție la 550 nm. Prin urmare activitatea citocromoxidazei se poate estima după viteză de scădere a extincției soluției de citocrom c redus la 550 nm.

Determinarea spectrofotometrică a activității citocromoxidazei în plante(Metoda Rubin, Cernovina și Miheeva)

Cu ajutorul acestei metode, activitatea citocromoxidazei poate fi determinată în suspensia de mitocondrii sau în extractul țesutului vegetal cercetat.

Reactivi. 1. Soluție tampon de fosfați de sodiu și potasiu M/15 cu pH 7,4.

2. Soluție de citocrom c redus. Se amestecă 3 ml soluție de citocrom c cu concentrația de $1,58.10^{-7}$ M într-un ml și 17 ml soluție tampon de fosfați M/15(pH 7,4). In amestecul obținut se reduce citocromul c cu 20 mg tiosulfat de sodiu. Excesul de tiosulfat se îndepărtează prin aerare sau agitare timp de 10-15 minute.

3. Fericianură de potasiu, $K_3[Fe(CN)_6]$.

Modul de lucru. Pregătirea materialului vegetal. Obținerea extractului enzimatic. Se mojarează la rece 200-300 mg țesut vegetal cu soluție tampon de fosfați M/15(pH 7,4) răcită. Suspensia obținută se transvazează într-un balon cotat de 25 ml și se completează la semn cu soluție tampon. Conținutul balonului se centrifughează la 3000-4000 rot./min. Supernatantul se toarnă într-un vas cu gheață sau zăpadă, unde se păstrează pînă la efectuarea determinării.

Izolarea mitocondriilor. Operația se efectuează la o temperatură cuprinsă între 0 și +5° C. Sticlăria și reactivii se răcesc în prealabil.

Se mojarează 5 g de material vegetal cu nisip de cuarț sau sticlă pisată, adăugîndu-se 15-20 ml soluție pentru izolare. Omogenatul obținut se centrifughează la rece timp de 10 minute, la 3000-4000 rot./min. Supernatantul se supune centrifugării într-o centrifugă cu răcire, la 15.000-19.000 rot./min., timp de 30 minute.

Centrifugatul se aruncă,iar reziduul din eprubetele de centrifugă se trece cu 2 ml soluţie pentru izolare într-un omogenizator, unde se triturează pînă la obţinerea unei suspensii uniforme.Suspensia de mitocondrii se transferă într-o eprubetă.Omogenizatorul se spală cu 2 ml soluţie pentru izolare care se adergă la suspensia de mitocondrii,amestecîndu-se cu aceasta.Pînă la determinarea activităţii enzimei,suspensia se ţine într-un vas cu gheaţă.

Compoziţia soluţiei pentru izolarea mitocondriilor :
soluţie tampon de fosfaţi de sodiu şi potasiu M/15 şi pH 7,4;
zaharoză 0,25-0,5 M ;
$MgSO_4$ 0,00001 M ;
La 100 ml soluţie tampon cu pH 7,4 se adaugă :
zaharoză -8,557-17,115 g
etilendiaminotetraacetat(EDTA) sau trilon B - - - - 20 mg
$MgSO_4$ - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1 ml soluţie 0,001 M

Măsurarea activităţii enzimei.Determinarea spectrofotometrică se realizează cu ajutorul spectrofotometrului,la lungimea de undă de 550 nm.

In cuva cu soluţia de control se pipetează 1,5 ml extract enzimatic şi 1,5 ml soluţie tampon de fosfaţi sar 0,5 ml suspensie de mitocondrii,1 ml soluţie pentru izolare şi 1,5 ml soluţie tampon.

Raportul între suspensia mitocondrială şi soluţia pentru izolare se poate modifica,în funcţie de activitatea enzimei.

Spectrofotometrul se reglează faţă de soluţia de control. Apoi se aduce în calea fasciculului luminos cuva cu probă conţinînd 1,5 ml extract enzimatic sau 1,5 ml suspensie mitocondrială diluată,după ce în această cuvă se adaugă dintr-o pipetă cu capilara largă(pentru ca soluţia să curgă repede) 1,5 ml soluţie de citocrom c redus şi se determină extincţia la 550 nm.Prima citire se face după 30 secunde de la adăugarea soluţiei de citocrom c şi pe urmă din minut în minut,timp de 10 minute.Intre citiri se verifică reglajul aparatului faţă de soluţia de control.

Sub acţiunea citocromoxidazei are loc oxidarea citocromului c,ceea ce se constată prin scăderea extincţiei.Viteza de scădere a extincţiei reflectă activitatea enzimei.

La sfîrşitul intervalului de 10 minute,în cuva cu proba de

cercetat se adaugă 1-2 cristale de fericianură de potasiu pentru oxidarea completă a citocromului c şi din nou se măsoară extincţia.

Calculul rezultatelor. Calculul activităţii enzimei se execută după formula :

$$A = \frac{\Delta lg(\text{citocrom c redus})}{\Delta t} = \frac{lg(D_1-D_3)-lg(D_2-D_3)}{t_2-t_1},$$

unde: A -activitatea citocromoxidazei, în unităţi convenţionale ;
D_1-extincţia iniţială a probei de cercetat (prima citire) ;
D_2-extincţia probei de cercetat la sfîrşitul experienţei ;
D_3-extincţia probei de cercetat după adăugarea fericianurii de potasiu ;
t -timpul.

Rezultatele se raportează la unitatea (g) de biomasă umedă sau la mg proteină.

8.4.8.2. DETERMINAREA ACTIVITATII ADENOZINTRIFOSFATAZEI

Adenozintrifosfataza (ATP-fosfohidrolaza sau ATP-aza) din ţesuturile vegetale şi animale constituie un sistem enzimatic complex, al cărui rol biologic nu este studiat complet. Activitate adenozintrifosfatazică posedă nu numai citoplasma, dar şi toate centrele energetice ale celulei. După E.C.Slater (1958), în mitocondrii sînt localizate ATP-aze care se deosebesc după caracterul dependenţei de pH. Se presupune că aceste ATP-aze diferite corespund celor trei puncte de conjugare (fosforilare) din lanţul respirator (fig.8.1).

In mitocondrii, de asemenea, există o ATP-ază K,Na-dependentă care intră în compoziţia sistemului enzimatic participant la transportul activ al ionilor.

Pe baza datelor actuale (F.Farron, E.Racker, 1970) se conferă ATP-azei mitocondriale un rol mare în mecanismul de conjugare a oxidării şi fosforilării şi se presupune identitatea ATP-azelor cu factorii de conjugare.

In cloroplaste se evidenţiază cel puţin două ATP-aze : una activă la întuneric -ATP-aza Mg-dependentă şi ATP-aza indusă de lumină.

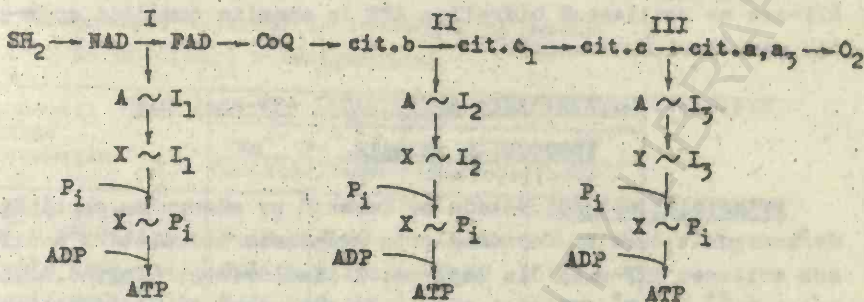


Fig.8.1.Lanţul respirator şi punctele de fosforilare(I,II,III)
SH_2-substratul supus oxidării ;
A - transportor adiacent la un punct de fosforilare ;
I şi X-factori de conjugare ;
P_i- ortofosfat anorganic.

In nucleu,de asemenea s-au descoperit cîteva ATP-aze,deosebite după însuşirile lor(solubilitate,pH optim şi afinitate faţă de substrat).

Rolul biologic al ATP-azelor constă în eliberarea energiei legăturii pirofosforice ca rezultat al hidrolizei ATP :



$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + H_3PO_4$$

De aceea ATP-azele au o însemnătate deosebită în etapa terminală a metabolismului energetic al celulei,în procesul de scindare şi sinteză a ATP.

Este necesar să reţinem că actualmente nu toţi cercetătorii susţin punctul de vedere conform căruia în organitele celulare se găsesc cîteva ATP-aze.De exemplu,ATP-aza Mg-dependentă din mitocondrii şi cloroplaste se consideră ca fiind legată cu structura acestor organite,în timp ce ATP-aza Ca-dependentă din cloroplaste este privită ca o enzimă ce şi-a pierdut legătura cu membrana. Nu-i exclus ca diferite ATP-aze să reprezinte formele moleculare ale uneia şi aceleiaşi enzime.Oubaina(strofantina)-inhibitor specific al ATP-azei K,Na-dependente din mitocondrii,nu manifestă nici un efect asupra ATP-azei Mg-dependente din nucleu.Se poate conchide că în diferite componente structurale ale celulei sînt

localizate diverse ATP-aze.Insă aceasta nu exclude prezenţa unei ATP-aze ce realizează hidroliza ATP în anumite condiţii concrete din structuri determinate.

8.4.8.2.1.DETERMINAREA ACTIVITATII ATP-azei DIN TESUTURILE ANIMALE

Principiul metodei.Metoda se bazează pe măsurarea cantităţii de P anorganic,care se formează prin scindarea hidrolitică a ATP, sub acţiunea ATP-azei din omogenatul tisular(centrifugat).Activitatea Mg^{2+},Na^{+},K^{+}-ATP-azei totale se estimează în prezenţa ionilor Mg^{2+},Na^{+},K^{+};activitatea Mg^{2+}-ATP-azei în prezenţa ionilor de magneziu,iar activitatea Na^{+},K^{+}-ATP-azei se calculează ca diferenţă între activitatea primelor două enzime.

Reactivi.1.Soluţie tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,4(25 ml soluţie de Tris=tris-(hidroximetil)-amino-metan 0,2 M se amestecă cu 42,5 ml soluţie de HCl 0,1 N şi după ce se corectează pH-ul la valoarea necesară,se completează la 100 ml cu apă bidistilată).

2.Soluţie de zaharoză 0,25 M şi EDTA 0,003 M în soluţie de Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,4;

3.Soluţie acid adenozintrifosforic(ATP) 20 mM,cu pH 7,4;

4.Soluţie de clorură de magneziu 60 mM,cu pH 7,4 ;

5.Soluţie de NaCl 100 mM;

6.Soluţie de KCl 20 mM ;

7.Soluţie de acid tricloracetic 20%.

Modul de lucru.Se cîntăresc 0,2 g ţesut animal şi se mojarează sau se omogenizează,la rece,timp de 5-10 minute cu 2 ml soluţie de zaharoză 0,25 M şi EDTA 0,003 N în soluţie tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4).Se determină activitatea ATP-azelor conform indicaţiilor din tabelul 8.8.

In eprubete pregătite anticipat se introduc componenţii 1,2, 3,4,7 pentru Mg^{2+},Na^{+},K^{+}-ATP-ază şi componenţii 1,2,7 pentru Mg^{2+}-ATP-ază.In controale şi probe se adaugă cîte 0,2 ml omogenat tisular.

In eprubetele cu probe se măsoară cîte 0,3 ml soluţie de ATP (component 5),se agită şi se incubează în termostat la 37°,timp de 30 minute.La sfîrşitul incubaţiei se pipetează în fiecare

Tabelul 8.8

Compoziţia mediului de incubaţie şi schema de efectuare a determinării

Componentul mediului de incubaţie	ATP-aza			
	Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}		Mg^{2+}	
	Control	Probă	Control	Probă
1. Soluţie Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 (ml)	0,40	0,40	0,40	0,40
2. Soluţie $MgCl_2$ (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10
3. Soluţie NaCl (ml)	0,10	0,10	-	-
4. Soluţie KCl (ml)	0,10	0,10	-	-
5. Soluţie ATP (ml)	-	0,30	-	0,30
6. Omogenat tisular (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2
7. Apă bidistilată (ml)	0,4	0,4	0,6	0,6
Incubaţie 30 minute la 37°C				
8. Soluţie de acid tricloracetic (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
9. Soluţie ATP (ml)	0,3	-	0,3	-

eprubetă 0,4 ml soluţie de acid tricloracetic 20%.

In paralel se execută cîte un control pentru fiecare probă conform tabelului, adăugîndu-se soluţia de acid tricloracetic înaintea omogenatului şi după aceasta soluţia de ATP.

Volumul probelor şi controalelor trebuie să fie în final 2 ml. Conţinutul eprubetelor se filtrează şi în 0,1 ml filtrat se determină fosforul anorganic după metoda Lowry şi Lopez, modificată Skulacev (vezi pag.101).

Calculul rezultatelor. Activitatea ATP-azei se evaluează după cantitatea de fosfor anorganic (în micrograme), scindat de la ATP, în timp de 30 minute, sub acţiunea enzimei dintr-un gram de ţesut animal :

$$A = (a_{cer} - a_m) \cdot \frac{2}{0,1} \cdot \frac{2}{0,2} \cdot \frac{1}{0,2} ,$$

unde: a_{cer} -cantitatea de fosfor anorganic, în micrograme, corespunzătoare extincţiei probei ;

a_m -cantitatea de fosfor anorganic, în micrograme corespunzătoare extincţiei controlului.

8.4.8.2.2. DETERMINAREA ACTIVITATII ATP-azei VEGETALE

Principiul metodei este acelaşi cu cel descris la determinarea ATP-azei în ţesuturile animale.

Reactivi. Reactivii 1-7 de la "Determinarea activităţii ATP-azei din ţesuturile animale".

Modul de lucru. Se mojarează 1 g material vegetal proaspăt (frunze, embrioni etc.) cu nisip de cuarţ sau sticlă pisată, într-un mojar răcit. După 5 minute de mojarare (obţinerea unei mase uniforme) se adaugă 4 ml soluţie de zaharoză 0,25 M şi EDTA 0,003 M în soluţie tampon Tris 0,05 M cu pH 7,4 şi se continuă operaţia de omogenizare încă 5 minute. Omogenatul se centrifughează la rece (0-4°C), timp de 10 minute, la 1000 G. Reziduul se suspendă în 2 ml soluţie de zaharoză şi EDTA în tampon Tris şi se centrifughează în aceleaşi condiţii. Supernatantele de la prima şi a doua centrifugare se unesc, folosindu-se ca sursă de ATP-ază.

Mediul de incubaţie este alcătuit din componenţii indicaţi în tabelul 8.9.

După adăugarea soluţiei de acid tricloracetic atît controalele cît şi probele se filtrează. Din fiecare filtrat se ia cîte 0,1 ml pentru determinarea fosforului anorganic după metoda Lowry şi Lopez în modificaţia lui Skulacev (vezi pag. 101).

Calculul rezultatelor. Prin interpretarea extincţiilor pe curba etalon se obţine concentraţia fosforului anorganic în micrograme.

Activitatea ATP-azei se exprimă în micrograme de fosfor anorganic format la 1 g de material vegetal :

$$A = (a_{cer} - a_m) \cdot \frac{2}{0,1} \cdot \frac{6}{0,6} ,$$

unde: a_{cer} -cantitatea de fosfor anorganic, în micrograme, în probă;

a_m -cantitatea de fosfor anorganic, în micrograme, corespunzătoare extincţiei controlului.

Rezultatele, de asemenea, se pot raporta la mg de proteină.

Tabelul 8.9

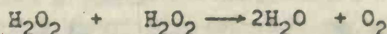
Compoziţia mediului de incubaţie şi schema de determinare a activităţii ATP-azei vegetale

Componenţii mediului de incubaţie	ATP-aza			
	Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}		Mg^{2+}	
	Control	Probă	Control	Probă
1. Soluţie Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
2. Soluţie $MgCl_2$ (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
3. Soluţie NaCl (ml)	0,1	0,1	-	-
4. Soluţie KCl (ml)	0,1	0,1	-	-
5. Soluţie ATP (ml)	-	0,3	-	0,3
6. Supernatant (ml)	0,5	0,6	0,6	0,6
7. Apă bidistilată (ml)	-	-	0,2	0,2
Incubaţie 30 minute la 30°C				
8. Soluţie de acid tricloracetic (ml)	0,4	0,4	0.4	0,4
9. Soluţie ATP (ml)	0,3	-	0,3	-

8.4.8.3. DETERMINAREA ACTIVITATII CATALAZEI

Catalaza (H_2O_2: H_2O_2-oxidoreductaza, EC 1.11.1.6) aparţine hemoproteinelor, cu alte cuvinte enzimelor bicomponente, care au drept grupare prostetică hemina, adică feriporfirina IX.

Rolul biologic al catalazei constă în descompunerea apei oxigenate din celula vie, conform reacţiei :



$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Acţiunea catalazei, de a scinda apa oxigenată în apă şi oxigen molecular, se corelează cu mersul multor reacţii biochimice ale metabolismului glucidic, lipidic şi proteic. Aceasta explică răspîndirea largă a catalazei în ţesuturile animalelor, plantelor şi în

microorganismele aerobe.

Activitatea catalazei poate fi determinată prin metode manometrice, titrimetrice etc.

8.4.8.3.1. DETERMINAREA ACTIVITATII CATALAZEI IN SINGE (METODA BACH-ZUBKOVA)

Principiul metodei. Metoda se bazează pe dozarea apei oxigenate rămasă nedescompusă, după întreruperea acţiunii catalazei. Dozarea apei oxigenate din proba de analizat şi din control se face prin titrare cu permanganat de potasiu în mediu acid :



$$5H_2O_2 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \longrightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

Activitatea catalazei se apreciază după diferenţa dintre cantitatea de permanganat utilizată la dozarea apei oxigenate în control şi probă.

Reactivi. 1. Soluţie de apă oxigenată 1%.

2. Soluţie de acid sulfuric 10%.

3. Soluţie de permanganat de potasiu 0,1 N. Se dizolvă 3,30 g permanganat de potasiu în 1000 ml apă distilată. Soluţia obţinută se transvazează într-un flacon din sticlă brună, închis bine cu dop rodat şi se lasă 7-8 zile la întuneric la temperatura camerei. Apoi se determină factorul soluţiei de permanganat cu ajutorul acidului oxalic.

Modul de lucru. Intr-un balon cotat de 100 ml se introduc aproximativ 50 ml de apă distilată şi se adaugă cu ajutorul unei micropipete 0,1 ml sînge proaspăt recoltat. Micropipeta se spală de cîteva ori cu soluţie din balon prin aspirare şi expulzie. Conţinutul balonului se amestecă pentru a se produce hemoliza totală şi se completează cu atenţie la semn cu apă distilată. Se obţine o soluţie de sînge cu diluţia de 1:1000.

In două flacoane conice se măsoară cîte 10 ml apă distilată şi cîte un ml de sînge diluat. Conţinutul unui flacon (control) se fierbe 3-5 minute pentru a inactiva catalaza, care este o enzimă termolabilă. După fierbere, flaconul se răceşte. Apoi se adaugă în fiecare flacon cîte 2 ml soluţie de apă oxigenată 1% şi se agită. Ambele flacoane se lasă în repaus pentru 30 de minute la tempera-

tura camerei.După trecerea acestui timp se introduc în fiecare flacon cîte 5 ml soluţie de acid sulfuric 10% pentru blocarea reacţiei de descompunere a apei oxigenate declanşată de catalază. Probele se titrează cu soluţie de permanganat de potasiu pînă la apariţia unei coloraţii slab roz.Dacă în timpul titrării se formează prea multă spumă,atunci în flacoane se adaugă cîte o picătură de alcool amilic.

<u>Calculul rezultatelor</u>.Pentru titrarea apei oxigenate în control s-au consumat n_1 ml soluţie de permanganat,iar pentru titrarea apei oxigenate,care a rămas nedescompusă în proba cu catalază activă,s-au consumat n_2 ml soluţie de permanganat.

Calcularea rezultatelor se efectuează ţinîndu-se seama de faptul că un ml soluţie de permanganat de potasiu N/10 este echivalent cu un ml soluţie de apă oxigenată N/10.Diferenţa n_1-n_2 reprezintă numărul mililitrilor de apă oxigenată N/10 descompusă de catalaza sanguină.Un ml soluţie de apă oxigenată N/10 conţine 1,7 mg de apă oxigenată.

Inmulţind numărul mililitrilor de apă oxigenată descompusă cu 1,7 se obţine cantitatea de apă oxigenată,exprimată în mg,descompusă în timp de 30 de minute de catalaza din 0,001 ml sînge, adică aşa-numita cifră catalazică.

<u>Valori normale</u>.In sîngele uman,cifra catalazică variază între 12 şi 20.La mamifere catalaza se găseşte exclusiv în eritrocite, fiind absentă în plasmă şi serul sanguin.

<u>Variaţii patologice</u>.Activitatea catalazei în sînge se modifică în organele atinse de procese tumorale,în unele afecţiuni ale ficatului,în bolile de iradiere.

8.4.8.3.2.<u>DETERMINAREA ACTIVITATII CATALAZEI IN PLANTE PRIN TITRARE IODOMETRICA</u>

<u>Principiul metodei</u>.Apa oxigenată rămasă nedescompusă,după un anumit timp de incubaţie cu catalaza,oxidează iodura de potasiu conform reacţiei :



$$H_2O_2 + 2KI + H_2SO_4 \longrightarrow 2H_2O + K_2SO_4 + I_2$$

Iodul pus în libertate este titrat cu o soluţie de tiosulfat

de sodiu de concentrație cunoscută,în prezența amidonului ca indicator :



$$I_2 + Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$$

In paralel cu proba se realizează și un control cu enzimă inactivată de la începutul incubației.Diferența între numărul ml de tiosulfat de sodiu consumat la titrarea apei oxigenate în control și numărul ml de tiosulfat consumat la titrarea apei oxigenate rămasă nedescompusă în probă reflectă activitatea catalazei din materialul cercetat.

Reactivi.1.Soluție de fosfat disodic 0,1 M.
2.Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,01 M cu pH 7.
3.Soluție de apă oxigenată 3%.
4.Soluție de acid sulfuric 10%.
5.Soluție de iodură de potasiu 10%.
6.Soluție de molibdat de amoniu 1%.
7.Soluție de amidon 1%.
8.Soluție de tiosulfat de sodiu 0,02N.

Modul de lucru.Extracția catalazei.Pentru obținerea catalazei din semințele ajunse la maturitate biologică,o cantitate de 0,1-0,2 g material fin omogenizat se extrage cu 3 ml soluție de fosfat disodic 0,1 M,într-o eprubetă de centrifugă,timp de 60 minute,agitînd din 10 în 10 minute cu ajutorul unei baghete de sticlă.Conținutul eprubetei se centrifughează timp de 15 minute,la 3000 rot./min.Supernatantul separat servește drept sursă de enzimă.

Dacă semințele cercetate nu pot fi măcinate,de asemenea în cazul frunzelor,tuberculelor,fructelor,se ia o anumită cantitate, în funcție de activitatea presupusă a catalazei,se mojarează la rece cu nisip de cuarț sau sticlă pisată.Apoi masa obținută se transferă cantitativ cu 5-10 ml soluție de fosfat disodic într-o eprubetă de centrifugă,după care se continuă extracția ca mai sus. Pentru îndepărtarea pigmenților din extractul enzimatic,acesta se congelează la -5°C timp de 18 ore și se centrifughează.Supernatantul se supune dializei în soluție tampon fosfat 0,01 M cu pH 7, timp de 2 ore și la 4°C.

<u>Determinarea activității catalazei în extract</u>.In două flacoane conice de 100 ml se măsoară cîte 6 ml soluție tampon de fosfați de sodiu 0,01 M cu pH 7 și cîte 0,1 ml extract enzimatic.Conținutul primului flacon care va servi drept martor se fierbe 3-5 minute pentru inactivarea catalazei.Apoi se răcește cu apă de robinet.In ambele flacoane se adaugă cîte 0,2 ml soluție de apă oxigenată 3%.După agitarea conținutului,flacoanele se lasă în repaus la temperatura de 20°C exact 5 minute din momentul pipetării apei oxigenate.

Acțiunea catalazei asupra apei oxigenate se întrerupe prin introducerea în fiecare flacon a cîte 5 ml soluție de acid sulfuric 10%.Pe urmă se toarnă cîte 5 ml soluție de KI 10% și una picătură din soluția de molibdat de amoniu 1%.Conținutul flacoanelor se agită cu atenție.

Iodul eliberat,în urma reacției dintre apa oxigenată nedescompusă enzimatic și iodura de potasiu,se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,02 N pînă la culoarea galben-pai.In acest moment se adaugă 2-3 picături de soluție de amidon 1% și se continuă titrarea pînă cînd culoarea apărută la adăugarea amidonului dispare complet.

Cantitatea de apă oxigenată descompusă sub acțiunea catalazei se află după diferența între rezultatele titrării martorului și probei.

<u>Calculul rezultatelor</u>.Ca unitate de activitate a catalazei se consideră acea cantitate de enzimă care descompune într-un minut un micromol de apă oxigenată(0,034 mg).

Intrucît la 1 ml soluție de tiosulfat de sodiu 0,02 N corespund 0,34 mg apă oxigenată,rezultă că la numărul de ml soluție de tiosulfat reprezentînd diferența dintre titrarea martorului(V) și probei(v) vor corespunde X mg H_2O_2 :

$$X = (V-v).F.0,34 \quad ,$$

unde:V -numărul ml de tiosulfat consumat la titrarea martorului ;
v -numărul ml de tiosulfat consumat la titrarea probei ;
F -factorul soluției de tiosulfat.

Cantitatea de apă oxigenată descompusă în timp de 1 minut de

catalaza dintr-un gram de material vegetal se calculează cu ajutorul formulei :

$$X_1 = \frac{(V-v).F.0,34.3}{5.0,1.0,1}$$

Dacă o unitate catalazică descompune 0,034 mg H_2O_2/min., atunci A unităţi catalazice vor scinda X_1 mg H_2O_2/min., de unde :

$$A = \frac{X_1}{0,034} = \frac{(V-v).F.0,34.3}{5.0,1.0,1.0,034} = (V-v).F.600$$

Observaţie. Pentru exactitatea rezultatelor se recomandă ca diferenţa V-v să nu fie mai mică de 1,5 ml şi mai mare de 3 ml. In primul caz în analiză se va lua un volum mai mare de extract catalazic, iar în al doilea caz extractul enzimatic se va dilua.

8.4.8.4. DETERMINAREA ACTIVITATII PEROXIDAZEI

Peroxidaza(donor : peroxid de hidrogen-oxidoreductaza, EC 1.11.1.7), este o enzimă bicomponentă aparţinînd hemoproteinelor. Ea îndeplineşte un rol deosebit în procesele oxidoreducătoare corelate cu respiraţia plantelor şi animalelor. Această enzimă catalizează oxidarea diferitelor substrate de natură chimică determinată, cu ajutorul apei oxigenate, conform reacţiei :



$$AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow A + 2H_2O \quad ,$$

unde: AH_2 -substratul supus oxidării şi
A -substratul oxidat.

Intre substratele care pot fi oxidate de peroxidază în prezenţa apei oxigenate, se numără următoarele :

-practic toţi fenolii(pirocatehină, pirogalol, acid galic, guaiacol etc.) liberi sau legaţi ;

-aminele aromatice(benzidină, parafenilendiamină şi altele);

-substanţele ugor oxidabile, de tipul acidului ascorbic, glutationului, nitriţilor etc.

Determinarea activităţii peroxidazei vegetale la fotoelectrocolorimetru FEKM

Principiul metodei. Metoda se bazează pe măsurarea timpului în care guaiacolul sau pirogalolul se oxidează sub acţiunea

peroxidazei în produsul de oxidare corespunzător,a cărui concentrație se stabilește anticipat la fotoelectrocolorimetru.

Reactivi.1.Soluție de guaiacol 183 mg în 25 ml apă distilată sau soluție de pirogalol 189 mg în 25 ml apă distilată ;
2.Soluție tampon de fosfați de sodiu M/15 cu pH 6,7 ;
3.Soluție de apă oxigenată 0,15%.

Modul de lucru.Pentru obținerea extractului enzimatic se mojarează 100-500 mg țesut vegetal cu soluție tampon de fosfați,se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 25 ml și se completează la semn cu aceeași soluție.După un repaus de 10-15 minute se centrifughează timp de 10 minute la 3000-4000 rot./min.Supernatantul se folosește ca sursă de enzimă.

In momentul determinării activității peroxidazei,în două cuve de 2 cm grosime se măsoară cîte 3,5 ml apă distilată,2 ml soluție tampon,0,5 ml extract enzimatic și 1 ml soluție de substrat (reactiv 1).Cuvele se introduc în suportul lor și se egalizează cele două fascicule luminoase,cînd acul microampermetrului se află la zero.Se stabilește tamburul din dreapta la diviziunea 0,125 sau 0,250 pe scala extincției ;acul microampermetrului se deplasează de la zero.In cuva din stînga se adaugă 2 ml apă distilată,iar în cuva din dreapta 2 ml apă oxigenată 0,15%,cu ajutorul unei pipete avînd capilara inferioară mai largă.Jetul de soluție favorizează agitarea conținutului cuvei.Simultan cu prima picătură de apă oxigenată se pune în funcție cronometrul.In cuva din dreapta soluția se colorează datorită oxidării guaiacolului la tetraguaiacol(maximul de absorbție la 470 nm =filtru albastru-verzui) sau pirogalolului la purpurogalină(maximul de absorbție la 430 nm =filtru violet),acul microampermetrului deplasîndu-se spre zero.Se notează timpul de la începutul adăugării apei oxigenate pînă extincția soluției din cuvă ajunge la valoarea fixată anticipat;acul microampermetrului revine la zero.Se efectuează trei determinări paralele,luîndu-se media lor.

Pentru măsurarea activității enzimei se recomandă să se cîntărească o asemenea cantitate de material,încît schimbarea culorii conținutului din cuvă să se producă în intervalul 20-50 secunde.

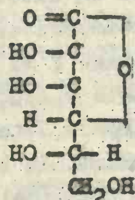
Calculul rezultatelor. Activitatea peroxidazei se calculează după viteza de reacţie în unităţi convenţionale şi se exprimă la 1 g de ţesut vegetal, conform formulei :

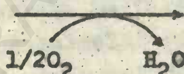
$$X = \frac{E.V.d}{0,5.t.p.l}$$,unde

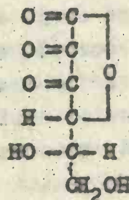
E-extincţia(0,125 sau 0,250) ;
V-volumul soluţiei pentru extracţie(25 ml) ;
d-gradul de diluare suplimentară a extractului enzimatic (dacă este cazul) ;
t-timpul, în secunde ;
p-greutatea materialului vegetal, în grame ;
l-grosimea stratului de lichid în cuvă(2 cm).

8.4.8.5. DETERMINAREA ACTIVITATII ASCORBATOXIDAZEI

Ascorbatoxidaza(L-ascorbat : O_2-oxidoreductaza, EC 1.10.3.3) catalizează oxidarea directă a acidului ascorbic în acid dehidroascorbic :







Acid L-ascorbic   Acid L-dehidroascorbic

Funcţionînd ca transportor de hidrogen, acidul ascorbic este strîns corelat cu toate sistemele enzimatice participante în metabolismul respirator al celulei vegetale.

Ascorbatoxidaza conţine în compoziţia sa 0,24% cupru, deci este o metalenzimă. Enzima din varză, castraveţi, dovleac, dovlecel manifestă o activitate foarte ridicată.

Determinarea activităţii ascorbatoxidazei(Metoda L.K.Ostrovskaia)

Principiul metodei. La baza metodei se află titrarea restului de acid ascorbic rămas neoxidat în mediul de reacţie.

Reactivi. 1. Soluţie tampon acid citric-fosfat disodic cu pH 6. Se amestecă 73,70 ml soluţie de acid citric 0,1 M cu 126,30 ml soluţie de $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 0,2 M.

2. Soluţie de acid ascorbic 100 mg%.

3. Soluţie de acid metafosforic 5%.

4. Soluţie de iodat de potasiu(KIO_3) 0,001 N.

5. Iodură de potasiu.

6. Soluţie de amidon 1%.

Modul de lucru. O cantitate de 1-2 g material vegetal(în funcţie de activitatea enzimei) se mojarează cu soluţie tampon acid citric-fosfat disodic(pH 6,0). După obţinerea unei mase omogene, se aduce la un volum de 25 sau 50 ml cu soluţie tampon şi se agită.

Intr-un flacon conic de 50 ml se introduc 2 ml de omogenat centrifugat sau filtrat conţinînd ascorbatoxidaza şi se adaugă 2 ml soluţie de acid ascorbic. Flaconul se ţine la temperatura de 25° sau 30°C timp de 60 minute. La sfîrşitul intervalului se inhibă ascorbatoxidaza cu 2 ml soluţie de acid metafosforic 5%.

In paralel se pregăteşte un control, măsurînd enzima, soluţia de acid metafosforic şi apoi soluţia de acid ascorbic.

Conţinutul flacoanelor se titrează cu soluţie de iodat de potasiu 0,001 N. Titrarea se efectuează în prezenţa unui cristal (5-10 mg) de KI şi a cîtorva picături de amidon. Sfîrşitul titrării se consideră apariţia unei coloraţii albastre.

Calculul rezultatelor. Activitatea ascorbatoxidazei se exprimă în mg de acid ascorbic oxidat la 1 g ţesut umed :

$$X = \frac{(n_1 - n_2) \cdot F \cdot v_1 \cdot 0,088}{v_2 \cdot p},$$

unde: n_1 -volumul(ml) soluţiei de iodat consumat la titrarea controlului ;

n_2 -volumul(ml) soluţiei de iodat consumat la titrarea probei ;

F -factorul soluţiei de iodat de potasiu ;

0,088-mg de acid ascorbic corespunzătoare la 1 ml soluţie de iodat de potasiu 0,001 N ;

v_1 -volumul total al omogenatului(ml) ;

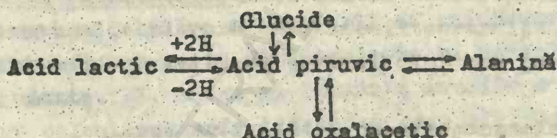
v_2 -volumul de omogenat sau filtrat luat pentru titrare(2 ml);
p -masa ţesutului cîntărit(g).

8.5.DOZAREA UNOR METABOLITI INTERMEDIARI SI FINALI AI METABOLISMULUI GLUCIDIC

8.5.1.DOZAREA ACIDULUI PIRUVIC

Acidul piruvic ocupă un loc central în multe procese metabolice,constituind veriga de legătură între metabolismul glucidic, lipidic şi proteic.Formîndu-se în glicoliză,acidul piruvic se poate transforma prin transaminare în alanină şi astfel se integrează în metabolismul proteinelor.Apoi,prin decarboxilare oxidativă acidul piruvic se transformă în acetil-CoA,care poate intra în reacţiile legate de metabolismul lipidelor sau poate să se oxideze la dioxid de carbon şi apă cu eliberare de energie.

Această poziţie centrală a acidului piruvic în metabolismul substanţelor poate fi ilustrată prin schema :



Principiul metodei.Acidul piruvic dă cu aldehida salicilică, în mediu puternic alcalin,o coloraţie portocalie care se poate colorimetra.

Reactivi.1.Soluţie de acid tricloracetic 6%.Se păstrează la frigider.

2.Soluţie de hidroxid de potasiu : 100 g de hidroxid de potasiu se dizolvă în 60 ml apă distilată.Dacă soluţia depune precipitat se ia pentru reacţie lichid supernatant limpede.

3.Soluţie de aldehidă salicilică 2% în alcool etilic 96%.Soluţia este stabilă cîteva luni.

4.Soluţie stoc de piruvat de sodiu.Se dizolvă 124,9 mg de piruvat de sodiu în 100 ml de apă distilată la balon cotat.

5.Soluţie etalon de piruvat de sodiu : într-un balon cotat de

50 ml se măsoară 1 ml din soluţia stoc de piruvat de sodiu şi se completează la semn cu apă distilată. Intr-un ml soluţie etalon se găsesc 0,02 mg de acid piruvic.

Modul de lucru. a) Deproteinizarea. Intr-o eprubetă de centrifugă se iau 3 ml de sînge oxalatat recoltat proaspăt, se adaugă 3 ml soluţie de acid tricloracetic 6%, se agită şi se lasă 5 minute în repaus. Apoi, se filtrează sau se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min.

b) Dezvoltarea culorii. In două eprubete se măsoară reactivii indicaţi în tabelul 8.10.

Tabelul 8.10

Reactivi	Probă	Control
Filtrat incolor şi transparent (ml)	1	-
Apă distilată (ml)	-	0,5
Soluţie de acid tricloracetic 6% (ml)	-	0,5
Soluţie de hidroxid de potasiu (ml)	1	1
Soluţie de aldehidă salicilică (ml)	0,5	0,5

Se agită bine şi se introduc eprubetele în baia de apă la 37°C pentru 10 minute. Se răcesc repede şi se citeşte extincţia probei de cercetat la fotoelectrocolorimetru, utilizînd filtrul albastru (470 nm) şi controlul ca lichid de compensaţie.

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea cantităţii de acid piruvic în volumul de filtrat luat pentru reacţia de culoare se trasează o curbă etalon conform tabelului 8.11.

Tabelul 8.11

Reactivi	Proba						
	1	2	3	4	5	6	7
Concentraţia acidului piruvic în probă (mg)	0,002	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020	0
Soluţie etalon de piruvat de sodiu (ml)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
Apă distilată (ml)	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0	1,0
Soluţie de KOH (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Soluţie de aldehidă salicilică (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Se agită bine,se termostatează timp de 10 minute la 37°C,se răcesc eprubetele și se colorimetrează probele 1-6 la 470 nm față de proba 7.

Se trasează curba etalon notînd pe ordonată extincțiile,iar pe abscisă-concentrația acidului piruvic în probe.

Notînd cu a mg de acid piruvic găsite pe curba etalon după extincția probei de cercetat,cantitatea de acid piruvic în 100 ml sînge se calculează cu ajutorul formulei :

$$\text{mg acid piruvic/100 ml sînge} = \frac{a.100}{0,5}.$$

Observație. Soluțiile stoc și etalon de acid piruvic sînt puțin timp stabile,așa că se vor prepara extemporaneu.

Variații fiziopatologice. In sîngele normal conținutul acidului piruvic reprezintă 0,5-1,5 mg%.

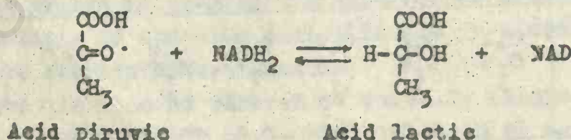
Creșterea concentrației de acid piruvic în sînge se constată după efort muscular,emoții puternice,regim alimentar bogat în glucide.

Cantitatea acidului piruvic în sînge poate să crească în avitaminoză B_1. Aceasta se explică prin aceea,că în lipsa vitaminei B_1, care sub formă de tiaminpirofosfat constituie una din coenzimele piruvatdehidrogenazei(piruvat: lipoat-oxidoreductaza,EC 1.2.4.1), este tulburat procesul de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic și ca urmare se observă acumularea acestui acid în sînge.

In unele cazuri creșterea acidului piruvic în sînge poate să fie provocată de anoxie și leziuni ale ficatului.

8.5.2. DOZAREA ACIDULUI LACTIC

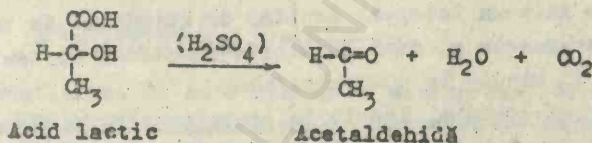
In organismul viu acidul lactic se formează în urma reacției de reducere a acidului piruvic sub acțiunea lactatdehidrogenazei (d-lactat: NAD-oxidoreductaza,EC 1.1.1.28) și cu participarea $NAD.H_2$:



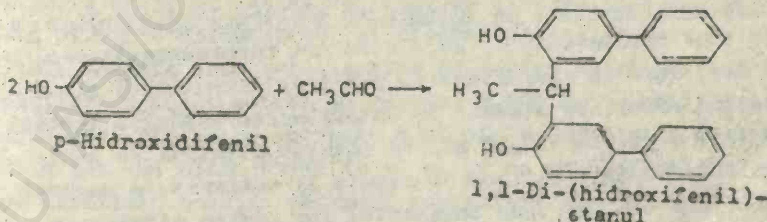
Acidul lactic este produsul final al glicolizei în condiţii anaerobe. In efortul muscular, cînd necesitatea de energie este asigurată temporar printr-o glicoliză intensă cantitatea acidului lactic creşte apreciabil în ţesutul muscular şi în sînge. Pe calea sîngelui acidul lactic ajunge la ficat, unde parţial se oxidează în acid piruvic (care se catabolizează aerob la CO_2 şi H_2O), iar parţial se transformă în glucoză sau glicogen.

In prezent cea mai răspîndită metodă de dozare a acidului lactic este <u>metoda colorimetrică Barker şi Summerson</u>. Mai jos se prezintă această metodă modificată.

<u>Principiul metodei</u>. Proteinele se îndepărtează prin precipitare cu acid tricloracetic, iar glucidele prin precipitare cu hidroxid de calciu în prezenţa sulfatului de cupru. Acidul lactic prezent în filtrat se transformă prin încălzire cu acid sulfuric concentrat în aldehidă acetică :



Aldehida acetică formată se condensează cu p-hidroxidifenilul, rezultînd 1,1-di-(hidroxidifenil)-etanul, care în prezenţa acidului sulfuric se oxidează într-un complex colorat în violet. Intensitatea culorii soluţiei este proporţională cu cantitatea de aldehidă, prin urmare şi cu cantitatea de acid lactic.



<u>Reactivi</u>. 1. Soluţie de acid tricloracetic 5%.
2. Soluţie de sulfat de cupru 20%.
3. Soluţie de sulfat de cupru 4%.
4. Hidroxid de calciu p.a.

5.Acid sulfuric concentrat(d=1,84).

6.Soluţie de p-hidroxidifenil 1,5% în soluţie de NaOH 0,5%. Se recomandă prepararea acestui reactiv în momentul utilizării. Nu se conservă decît 2-3 săptămîni.

7.Lactat de litiu(calciu sau zinc) sau acid lactic titrat pentru soluţia etalon.

Modul de lucru.a)Precipitarea proteinelor.In două eprubete de centrifugă se măsoară cu ajutorul unei pipete cîte 0,2 ml sînge sau ser.Se adaugă cîte 0,8 ml soluţie de acid tricloracetic 5%,se agită şi după ce se lasă în repaus timp de 30 minute se centrifughează.

b)Separarea glucidelor.Fără a se decanta supernatantul şi fără a se aduce în suspensie precipitatul se adaugă 0,40ml soluţie de sulfat de cupru 20%,apoi 0,250 g de hidroxid de calciu fin pulverizat şi 0,35 ml apă distilată.Se agită supernatantul din 5 în 5 minute într-un interval de timp de 20 minute.Se trece precipitatul în suspensia şi după 10 minute amestecul se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min.

c)Transformarea acidului lactic în acetaldehidă.Se măsoară cîte 0,5 ml centrifugat limpede în alte eprubete curate,introduse într-un pahar cu apă rece sau mai bine cu amestec de apă şi gheaţă.In fiecare eprubetă se adaugă cîte 0,05 ml(o picătură) soluţie de sulfat de cupru 4% şi picătură cu picătură,3 ml de acid sulfuric concentrat.Amestecul se agită cu atenţie şi eprubetele se introduc pentru 5 minute în baia de apă la fierbere, după care se răcesc la temperatura de 20°C.

d)Efectuarea reacţiei de culoare cu p-hidroxidifenilul.In eprubetele bine răcite(pînă la 20°C,o răcire necorespunzătoare a amestecului duce la descompunerea p-hidroxidifenilului şi ca atare se obţin rezultate scăzute în determinarea acidului lactic) se adaugă cîte o picătură(0,05 ml) de soluţie alcalină de p-hidroxidifenil.Eprubetele se lasă 30 minute la temperatura camerei, agitînd uşor din timp în timp conţinutul lor pentru dizolvarea precipitatului format prin adăugarea p-hidroxidifenilului.In acest timp,amestecul de reacţie capătă culoarea albastră.După ce au trecut 30 de minute,eprubetele se introduc timp de 90 secunde într-o baie de apă la fierbere.In cursul acestei fierberi are

loc clarificarea amestecului ca urmare a distrugerii excesului de p-hidroxidifenil,iar culoarea albastră trece în culoarea violet, stabilă mult timp(pînă la 3 ore).

e)Măsurarea intensităţii culorii.După fierbere eprubetele se răcesc în apă rece şi se determină intensitatea culorilor la un electrofotocolorimetru la 560 nm.Colorimetrarea se efectuează faţă de proba de control pentru reactivi.Această probă se realizează în paralel cu probele de cercetat începînd de la momentul"c".In loc de centrifugat se măsoară 0,5 ml apă distilată şi,apoi se procedează la fel ca şi în cazul probelor cu centrifugat.

Calculul rezultatelor.După media extincţiilor probelor de cercetat se găseşte pe curba etalon concentraţia acidului lactic în volumul de centrifugat luat pentru reacţia de culoare.

Cantitatea de acid lactic,exprimată în mg,în 100 ml sînge se calculează după formula :

$$X = \frac{a.2.100}{0,5.0,2.1000} = a.2$$

unde:a -cantitatea de acid lactic(în micrograme),corespunzătoare extincţiei probei de cercetat,găsită pe curba etalon ;
100-coeficient de transformare în procente :
1000-coeficient de transformare în mg ;

Construirea curbei etalon.Pentru obţinerea curbei etalon se poate utiliza o soluţie titrată de acid lactic sau o soluţie de lactat de litiu,zinc sau calciu.Dacă se foloseşte lactatul de litiu se procedează în modul următor.Intr-un balon cotat de 100 ml se introduc 53,32 mg lactat de litiu,se dizolvă în 5 ml soluţie de acid sulfuric diluat(1:10) şi se completează la semn cu apă distilată.Aceasta este soluţia stoc de lactat de litiu.Intr-un ml de soluţie preparată astfel se găseşte 0,500 mg de acid lactic.Cu ajutorul unei pipete se introduc 4 ml din soluţia stoc de lactat de litiu într-un balon cotat de 50 ml şi se completează la semn cu apă distilată.Soluţia obţinută reprezintă soluţia etalon.Un ml din această soluţie conţine 0,040 mg acid lactic.

Pentru construirea curbei etalon se prepară seria de soluţii etalon indicată în tabelul 8.12.

Tabelul 8.12

Reactivi	Proba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentraţia acidului lactic în probă(micrograme)	1	2	4	8	12	16	20	0
Soluţie etalon de lactat(ml)	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0
Apă distilată(ml)	0,475	0,45	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0,5

Cu seria de soluţii preparată se efectuează reacţia de culoare în modul descris mai sus(începînd de la momentul "c").

Măsurarea extincţiei se realizează la 560 nm,faţă de proba de control(proba 8).

Inainte de a trasa curba etalon se repetă reacţia de culoare încă de două ori,de fiecare dată pregătindu-se o nouă soluţie etalon.Curba etalon se construieşte folosind mediile extincţiilor găsite în cele trei repetiţii.

Observaţii.In prezenta metodă foarte mare importanţă are spălarea corectă a sticlăriei.După indicaţiile autorilor,rezultatele pot fi influenţate chiar de simpla atingere cu degetul a pereţilor interiori ai eprubetei,din cauza prezenţei acidului lactic în transpiraţie.Pentru îndepărtarea urmelor ionului de crom care împedică dezvoltarea culorii,sticlăria se spală cu apă distilată după tratarea cu amestec cromic şi se introduce într-o soluţie de hidroxid de sodiu N/10 timp de 30-40 minute,apoi se repetă spălarea cu o cantitate mare de apă distilată şi se usucă. Se poate curăţa stclăria şi prin fierbere timp de 30 minute în soluţie de detergent 0,5%,se spală de două ori cu apă distilată în care se fierbe 20 minute,se clăteşte şi se usucă.

Valori fiziologice.In sîngele omului sănătos aflat în repaus concentraţia acidului lactic este de 5-20 mg%.După efortul muscular concentraţia acidului lactic sanguin poate creşte ca urmare a intensificării procesului de glicoliză anaerobă în muşchi.

Bibliografie : 6,13,14,20,29,30,34,39,42,43

9. LIPIDE SIMPLE SI LIPIDE COMPLEXE. METABOLISMUL LOR

Lipidele alcătuiesc un grup de compuşi organici care se caracterizează prin eterogenitatea structurală şi funcţională.

Din numeroasele variante de clasificare a acestor substanţe s-a impus cea care separă lipidele în două mari grupe :

-lipide simple(neutre) şi

-lipide complexe(amfifilice).

In grupa lipidelor simple intră trigliceridele,ceridele,steridele etc.,iar lipidele complexe cuprind fosfolipide,glicolipide, lipoproteine.

9.1. DETERMINAREA LIPIDELOR TOTALE

Pentru dozarea lipidelor totale s-au propus numeroase metode,care pot fi grupate astfel :

a)Metode gravimetrice constînd în extracţia lipidelor totale din ţesutul analizat cu un solvent sau sistem de solvenţi,purificarea extractelor,uscarea şi cîntărirea reziduului lipidic. Aceste metode se disting prin specificitate şi exactitate,însă sînt foarte laborioase,necesită o cantitate mare de material biologic şi mult timp pentru efectuarea analizei.

b)Metodele oxidative în care se realizează oxidarea lipidelor cu dicromat de potasiu sau acid cromic,urmată de titrare sau colorimetrare.

c)Metode turbidimetrice,bazate pe compararea turbidităţii standardului şi soluţiei de cercetat.Valorile obţinute prin aceste metode nu sînt totdeauna cantitative.

d)Metode colorimetrice care au la bază reacţia de culoare dată de lipide cu reactivul constituit din vanilină,acid fosforic şi acid sulfuric.Majoritatea autorilor care folosesc pentru dozarea lipidelor totale reacţia cu reactivul sulfofosfovanilic apreciază că metoda este rapidă,tehnic simplă şi dă rezultate comparabile cu metodele gravimetrice.

9.1.1. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE IN TESUTURILE ANIMALE PRIN METODA FOLCH SI COLABORATORII, MODIFICATA DE I.F.DUMITRU

Principiul metodei. Lipidele totale sînt extrase din ţesutul animal analizat cu ajutorul unui amestec de cloroform şi alcool metilic. Din extractul lipidic obţinut se îndepărtează impurităţile nelipidice prin spălare cu apă. După uscarea reziduului lipidic se dozează lipidele totale pe cale gravimetrică.

Reactivi. 1. Cloroform.
2. Alcool metilic.

Modul de lucru. Obţinerea extractului lipidic şi purificarea lui. Proba de ţesut (ţesut cerebral: 200-250 mg; ficat: 300-400 mg ; muşchi : 400-500 mg) se triturează într-un mojar cu nisip de cuarţ sau sticlă pisată. Masa omogenă obţinută se trece cantitativ cu 25 ml amestec de cloroform-alcool metilic (2:1) într-o eprubetă cu dimensiunile de 16/180 mm. Eprubeta se închide cu dop de cauciuc şi conţinutul ei se agită energic timp de 10 minute. Apoi conţinutul eprubetei se filtrează, prin hîrtie de filtru cantitativă, într-o eprubetă gradată de 25 ml sau într-un balon cotat de 25 ml. Reziduul şi filtrul se spală cu amestec de cloroform-metanol (2:1) pînă se completează volumul filtratului la 25 ml.

Pentru îndepărtarea impurităţilor nelipidice şi acvosolubile, într-un pahar Berzelius de 25(50) ml se măsoară 15(40) ml apă distilată şi apoi încet şi cu atenţie, se introduc 10 ml de extract lipidic cu pipeta sub stratul de apă, evitîndu-se agitarea şi amestecarea celor două lichide. Paharul Berzelius este imersat într-un vas care conţine 400-500 ml apă distilată. Vasul se acoperă cu o placă de sticlă şi se lasă în repaus timp de 24 de ore. La sfîrşitul acestei perioade de timp, în paharul Berzelius se pot observa trei faze distincte :

-faza superioară, limpede, conţinînd apă şi alcool metilic, se găseşte în contact direct cu apa din vasul de spălare ;

-faza inferioară cloroformică, puternic opalescentă ;

-la limitele de separare a celor două faze, o peliculă albă, densă şi unitară care conţine lipide şi lipoproteine.

Uscarea extractului lipidic şi dozarea gravimetrică a lipidelor. Paharul Berzelius este scos din vasul de spălare şi faza superioară se îndepărtează prin sifonare, lăsîndu-se deasupra peliculei albe un strat de lichid (amestec de apă şi alcool metilic) gros de 2-3 mm, evitîndu-se astfel distrugerea ei. In paharul Berzelius se adaugă cu o pipetă 3-5 ml de alcool metilic pur pentru dizolvarea peliculei de lipide şi conţinutul paharului se agită. Dacă pelicula lipidică nu se dizolvă complet, se adaugă alcool metilic, picătură cu picătură, pînă cînd soluţia devine perfect transparentă.

După dizolvarea completă a peliculei lipidice conţinutul paharului Berzelius se trece cantitativ, prin spălări repetate cu cantităţi mici de alcool metilic (0,5-1 ml), într-o fiolă de cîntărire sau într-o capsulă de porţelan (sticlă).

Extractul lipidic se usucă mai întîi la temperatura camerei, timp de 24 de ore, iar apoi în termostat, la temperatura de 50-60°C. Uscarea extractului se continuă pînă la obţinerea, prin cîntărirea repetată a fiolei (capsulei), a unei valori constante.

Calculul rezultatelor. Făcînd diferenţa dintre greutatea fiolei (capsulei) cîntărite cu şi fără reziduu lipidic se află cantitatea de lipide corespunzătoare volumului de extract lipidic utilizat pentru purificare prin spălare. Cantitatea de lipide totale din ţesutul analizat se exprimă în grame la 100 g de ţesut, conform formulei :

$$X = \frac{a \cdot 25 \cdot 100}{10 \cdot p},$$

unde: a - masa reziduului lipidic (g) rămas în fiolă (capsulă) după uscare şi cîntărire ;

p - cantitatea de ţesut animal (g) luată pentru dozarea lipidelor.

Importanţa practică. Metoda gravimetrică de dozare a lipidelor totale în ţesuturile animale are o eroare medie de 2-3%. Deşi nu este rapidă, metoda se caracterizează prin simplitate tehnică. Dozarea lipidelor totale în creier, ficat, inimă, muşchi, splină etc., prin metoda Folch în modificarea descrisă, permite obţinerea unei imagini obiective asupra stării funcţionale a organelor menţiona-

te în diferite stări fiziopatologice.

9.1.2. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE IN SERUL SANGUIN PRIN METODA CU REACTIVUL SULFOFOSFOVANILIC

Principiul metodei. Produşii de scindare a lipidelor nesaturate formează cu reactivul alcătuit din acid sulfuric, acid fosforic şi vanilină, un complex colorat a cărui intensitate este proporţională cu cantitatea de lipide totale din serul sanguin.

Reactivi. 1. Acid sulfuric concentrat p.a., cu densitatea 1,84.

2. Acid fosforic concentrat p.a., cu densitatea 1,70-1,75.

3. Soluţie de vanilină 40 mM. Se dizolvă 0,6 g vanilină în 10-15 ml apă distilată prin încălzire pe baia de apă; după răcire volumul se completează la 100 ml cu apă distilată.

4. Amestec fosfovanilic. Se amestecă 4 părţi de acid ortofosforic concentrat cu 1 parte soluţie de vanilină 0,6%.

5. Cloroform chimic pur.

6. Soluţie standard de trioleină. Se dizolvă 760 mg trioleină în 100 ml cloroform, la balon cotat. Soluţia de trioleină cu această concentraţie dă o reacţie de culoare de aceeaşi intensitate ca şi cea produsă de un ser sanguin conţinînd 1000 mg lipide totale/100 ml. Ca standard mai poate fi folosită şi o soluţie de colesterol 1000 mg/100 ml în cloroform.

Modul de lucru. In eprubete obişnuite se pipetează separat 0,05 ml ser(probă), 0,05 ml soluţie standard(proba standard) şi 0,05 ml apă distilată(control reactivi). In fiecare eprubetă se adaugă cîte 2,5 ml acid sulfuric concentrat şi se agită conţinutul lor. Eprubetele se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă la fierbere. Cînd se scot din baia de apă, eprubetele se răcesc imediat, cu apă de robinet, la temperatura camerei.

Din fiecare eprubetă se pipetează cîte 0,2 ml soluţie care se introduce în alte eprubete conţinînd cîte 3 ml amestec fosfovanilic(reactiv 4). După agitare, eprubetele se lasă în întuneric timp de 45 minute, la temperatura camerei. Se dezvoltă o culoare roz care se fotometrează faţă de control la 530 nm(filtru verde).

Calculul rezultatelor. Cantitatea lipidelor totale în serul sanguin se poate calcula cu ajutorul formulei :

$$\text{mg lipide totale/100 ml ser} = \frac{E_{proba} \times 1000}{E_{standard}}$$

Observaţii.1.Serul sanguin se poate ţine la frigider 3-6 zile.

2.Deoarece reactivul fosfovanilic şi acidul sulfuric au vîscozităţi mari,se recomandă adăugarea lor cu ajutorul unei biurete.

3.Sticlăria folosită pentru determinarea lipidelor se va spăla separat.Este necesar ca să fie spălată cu multă apă distilată şi în final cu alcool.

Insemnătatea practică.Valorile normale ale lipidelor totale în sînge(lipemia) sînt cuprinse între 500-800 mg/100 ml ser.

Lipemia variază în funcţie de vîrstă,sex,rasă,alimentaţie, echilibru neuroendocrin,climă,profesie,sarcină.

Concentraţia lipidelor totale în sînge se modifică şi într-o serie de stări patologice.Astfel,la diabetici,alături cu hiperglicemia,se observă o hiperlipemie puternic exprimată(1000-2000 mg%).In nefroza lipoidică conţinutul lipidelor în sînge atinge valori încă mai ridicate(1000-5000 mg%).Hiperlipemia este un fenomen constant în ciroza biliară a ficatului şi în hepatitele acute.Creşterea conţinutului de lipide în sînge se descoperă la persoanele suferinde de nefrită cronică şi acută.

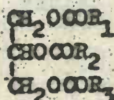
Valori crescute ale lipidelor totale în serul sanguin se evidenţiază în hiperlipemia esenţială,obezitate,hipotiroidie, pancreatită,ateroscleroză.

9.2.ANALIZA TRIGLICERIDELOR

Trigliceridele sau grăsimile neutre sînt larg răspîndite în celulele vegetale şi animale.Există grăsimi de rezervă şi grăsimi protoplasmatice.Ultimele reprezentînd o parte componentă a protoplasmei au o compoziţie constantă şi nu se catabolizează nici în cazul că organismului îi lipseşte hrana.

Grăsimile de rezervă se acumulează în cantitate mare în seminţele şi fructele multor plante,care servesc adesea ca materie primă pentru obţinerea grăsimilor vegetale,numite şi uleiuri.

Grăsimile neutre sau trigliceridele sînt un amestec de esteri ai glicerolului cu acizi grași superiori :



unde R_1,R_2 și R_3-radicali de acizi grași.

In compoziția grăsimilor predomină acizii grași saturați,ca de exemplu,acizii palmitic $[CH_3(CH_2)_{14}COOH]$ și stearic $[CH_3(CH_2)_{16}COOH]$ și acizii nesaturați-oleic $[CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH]$,linolic $[CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH]$ și linolenic $[CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH]$.Unele grăsimi,de exemplu, din nuca de cocos,din lapte etc.,conțin în compoziția lor pe lîngă acizii amintiți mai sus și acizi grași cu greutate moleculară mică,ca acizii butiric $[CH_3(CH_2)_2COOH]$,caproic $[CH_3(CH_2)_4COOH]$, caprilic $[CH_3(CH_2)_6COOH]$ și alții.

Grăsimile se diferențiază după proprietățile lor,care sînt caracterizate de o serie de constante: indice de aciditate,indice de saponificare,indice de iod etc.

Analiza grăsimilor cuprinde determinarea conținutului lor în organele plantelor sau în țesuturile animale și stabilirea constantelor specifice grăsimii date.

9.2.1.DETERMINAREA GRASIMII BRUTE IN PLANTE

Metodele de determinare a conținutului de grăsime se bazează mai ales pe proprietatea acesteia de a se dizolva în diferiți solvenți organici.Grăsimea se extrage complet din materialul biologic cercetat cu ajutorul unui solvent adecvat și se determină pe cale gravimetrică după evaporarea extractului la sec sau se calculează în funcție de greutatea probei degresate.Intrucît,sub acțiunea solvenților organici de obicei se extrag nu numai grăsimile,ci și acizii grași ,clorofila,carotenoidele,uleiurile eterice,glicerofosfatidele,sterolii etc.,preparatul obținut(în care predomină grăsimile) se numește adesea grăsime "brută".

9.2.1.1.METODA SOXHLET

Principiul metodei.Grăsimile se extrag la cald din materialul de provenienţă vegetală cu ajutorul solvenţilor organici(eter etilic,eter de petrol,cloroform,dicloretan etc.) şi se determină gravimetric după evaporarea extractului la sec.

Pentru extracţie se foloseşte aparatul de tip Soxhlet(fig. 9.1).Aparatul este format din trei părţi demnotabile :

-balonul termorezistent cu şlif A,în care se încălzeşte solventul şi se colectează extractul ;

-extractorul B cu şlifuri la ambele extremităţi,în care se introduce un cartuş din hîrtie poroasă C,conţinînd materialul de extras. Extractorul B este prevăzut cu două tuburi laterale de sticlă:un tub mai larg 1,pentru trecerea vaporilor de solvent din balonul A în partea superioară a aparatului şi un tub subţire 2,care serveşte la sifonarea extractului din extractorul B în balonul A;

-refrigerentul cu reflux D prevăzut cu bule.

Incălzirea aparatului se face pe o baie de apă electrică,din cauza inflamabilităţii solventului organic.In caz că se foloseşte gaz pentru a încălzi baia de apă,flacăra becului se va stinge ori de cîte ori montăm sau demontăm aparatul.

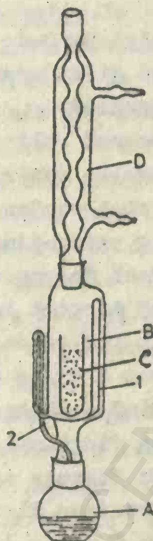


Fig.9.1.Aparatul Soxhlet

Modul de lucru.După bogăţia în grăsimi,se introduce o cantitate de 2-12 g din materialul vegetal,uscat şi fin măcinat,în cartuşul C,care în prealabil a fost cîntărit împreună cu dopul său de vată degresată.Materialul prelucrat se acoperă la partea superioară cu dopul de vată şi se recîntăreşte cartuşul la balanţa analitică.Prin diferenţă se află cantitatea exactă a materialului luat pentru extracţie.Cartuşul C se introduce în extractorul B.Inălţimea cartuşului folosit trebuie să fie cu circa

0,5 cm mai mică decît nivelul curburii superioare a sifonului 2, deoarece altfel s-ar putea ca materialul din partea superioară a cartuşului să nu fie complet spălat de solvent,iar grăsimea aflată acolo să fie numai parţial extrasă.

Balonul A perfect curat şi uscat,conţinînd cîteva bucăţi de piatră ponce degresate se cîntăreşte la balanţa analitică.In balonul A se introduce pînă la 2/3-3/4 din volumul lui solventul folosit pentru extracţie.Balonul A se uneşte cu extractorul B, introducînd partea inferioară a acestuia în gîtul balonului.După aceasta se fixează balonul pe o baie de apă rece şi la partea superioară a extractorului se montează refrigerentul D,prin care se trece apă rece.

După instalarea completă a aparatului Soxhlet pe baia de apă,conţinutul balonului A se încălzeşte treptat şi moderat pentru ca fierberea solventului să nu fie prea puternică.

Funcţionarea aparatului va începe cu evaporarea solventului, ai cărui vapori ajung prin tubul lateral 2 în partea superioară a extractorului B,trec în refrigerentul D,unde sînt condensaţi. Picăturile de lichid cad în cartuşul C,dizolvă o parte din grăsimea conţinută în materialul analizat şi se adună în partea inferioară a extractorului.Solventul se acumulează treptat în extractorul B şi cînd nivelul lichidului va depăşi înălţimea tubului lateral 2,extractul(solventul care a dizolvat o parte din grăsime) va sifona în balonul A.După această primă sifonare,extracţia se repetă din nou,potrivind intensitatea fierberii în aşa fel,încît să se realizeze 3-4 sifonări pe oră.Cu fiecare extracţie,în balonul A sînt aduse noi cantităţi din grăsimea dizolvată.

Durata extracţiei variază între 5-12 ore,în funcţie de cantitatea şi natura materialului cercetat.In cadrul lucrărilor practice extracţia se poate efectua în decurs de 1,5 ore.

După terminarea extracţiei,solventul din balonul A,în care se găseşte dizolvată grăsimea,se distilă.Balonul cu grăsimea aflată în el este uscat în termostat la 60-70°C pînă la greutate constantă.De obicei uscarea se face în termostat de vid sau în atmosferă de dioxid de carbon.

<u>Calculul</u> <u>rezultatelor</u>.Diferenţa dintre greutatea balonului cu reziduul rămas după evaporarea solventului şi greutatea

inițială reprezintă cantitatea de grăsime prezentă în eșantionul de material vegetal cercetat. Cantitatea de grăsime (X) în 100 g de material vegetal uscat se calculează cu ajutorul formulei :

$$X = \frac{(g_1 - g_2).100}{G(100-u)} ,$$

unde : g_1 - greutatea balonului cu grăsimea extrasă, în g ;
g_2 - greutatea balonului gol, în g ;
G - greutatea materialului supus extracției, în g ;
u - conținutul procentual al umidității în materialul analizat.

Observație. In cazul semințelor oleaginoase care nu se pot măcina bine din cauza conținutului lor ridicat în grăsime se procedează astfel : se ia o cantitate exact cîntărită de semințe, se zdrobesc cît mai bine posibil într-un mojar, apoi se trece totul, fără pierderi în cartușul de extracție, cu ajutorul unei spatule fine. Fără a-l astupa cu dopul de vată, se ține cartușul cu proba zdrobită timp de 1 oră într-o etuvă la 110^{o}C, în atmosferă de gaz inert. După răcire în exicator, se introduce cartușul în extractorul B, se clătește spatula, pistilul și mojarul cu solventul folosit pentru extracție, turnîndu-se soluția, fără pierderi, printr-o pîlnie cu coada lungă peste substanța din cartuș. Se repetă operația de spălare de trei ori, se astupă cu un dop de vată degresată, se mai adaugă în aparat cantitatea necesară de solvent și se extrage grăsimea timp de două ore. Se întrerupe apoi extracția, se scoate cartușul din aparat și se usucă. Materialul degresat parțial se scoate fără pierderi din cartuș și se sfarmă din nou în mojar, cît mai uniform și fin posibil. Se trece materialul din nou în cartuș, fără pierderi, spălînd de trei ori cu solvent, ca mai sus, apoi se continuă procesul pînă la extracția completă a grăsimii din materialul analizat.

9.2.1.2. METODA DE DETERMINARE A GRASIMII BRUTE DUPA GREUTATEA MATERIALULUI DEGRESAT

Această metodă este comodă în determinările de serie.

Principiul metodei. Din materialul vegetal uscat se extrage grăsimea cu eter etilic şi după greutatea probei degresate, se calculează cantitatea de grăsime brută în materialul analizat.

Modul de lucru. Intr-un plic de hîrtie de filtru, în prealabil uscat la 110°C şi cîntărit, într-o fiolă închisă, se introduce circa 1 g material de analizat. Plicul se închide şi se usucă în termostat la 110°C pînă la greutate constantă. Apoi, plicul cu proba de cercetat se introduce în extractorul aparatului Soxhlet şi se extrage cu eter etilic timp de trei ore. După terminarea extracţiei, se scoate plicul din aparat şi se lasă cîteva minute pe o sticlă de ceas pînă la evaporarea celei mai mari părţi din eterul cu care este îmbibată hîrtia, apoi se introduce în fiola folosită iniţial, se usucă timp de 1 oră într-o etuvă la 100-105°. Se răceşte fiola cu plicul conţinînd materialul degresat în exsicator şi se cîntăreşte la balanţa analitică.

Calculul rezultatelor. Greutatea grăsimii brute în proba cercetată se află prin diferenţa dintre greutatea iniţială a plicului cu material şi greutatea lui finală.

Conţinutul procentual în grăsime brută (X) la substanţa uscată se găseşte după formula :

$$X = \frac{(g_1-g_2) \cdot 100}{G},$$

unde: g_1 -greutatea plicului cu materialul supus extracţiei, după uscare, în grame;

g_2 -greutatea plicului cu materialul degresat, după uscare, în grame;

G -greutatea materialului analizat după uscare, în grame;

100-coeficient de transformare în procente.

9.2.2. DOZAREA TRIGLICERIDELOR IN SERUL SANGUIN (METODA TIXIER SI CLAUDE)

Principiul metodei. Trigliceridele din ser sînt hidrolizate cu eliberarea glicerolului care se oxidează sub acţiunea acidului periodic în formaldehidă. Formaldehida este determinată cantitativ prin reacţia de culoare pe care o dă cu fenilhidrazina în mediu acid.

Reactivi. 1. Soluţie alcoolică de KOH 4%.

2. Soluţie de sulfat de magneziu($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 3,7%.

3. Soluţie de H_2SO_4 2 N.

4. Soluţie de metaperiodat de sodiu 2,25%. Se dizolvă 0,225 g metaperiodat de sodiu în 10 ml apă distilată. Soluţia se conservă în sticlă brună la rece timp de o săptămînă.

5. Soluţie clorhidrat de fenilhidrazină 4%. Soluţia este stabilă o săptămînă la rece şi la întuneric.

6. Soluţie de HCl 5 N.

7. Soluţie standard de tripalmitină. Se dizolvă 100 g de tripalmitină în 100 ml cloroform.

Modul de lucru. Saponificarea trigliceridelor. Se iau trei eprubete de centrifugă. In prima eprubetă(probă) se pipetează 0,1 ml ser, în a treia eprubetă(standard) -0,1ml soluţie standard şi în ultima(control) -0,1 ml apă distilată. Se adaugă cîte 0,5 ml soluţie alcoolică de KOH în fiecare eprubetă. Eprubetele se introduc într-o baie de apă sau într-un termostat la 37°C timp de o oră sau la 60°C timp de 30 minute. La sfîrşitul perioadei de incubaţie, eprubetele se scot din baia de apă(termostat) şi se măsoară în fiecare din ele cîte 1 ml soluţie de sulfat de magneziu şi 3 ml apă distilată. Se agită conţinutul eprubetelor.

In paralel cu proba, standardul şi controlul, se efectuează un martor pentru glicerolul liber din ser. In acest scop se măsoară într-o eprubetă de centrifugă 0,1 ml ser, 1 ml soluţie de sulfat de magneziu, 3 ml apă distilată şi 0,5 ml soluţie alcoolică de KOH. Mai departe se procedează identic cu celelalte probe.

La adăugarea sulfatului de magneziu se formează un precipitat abundent de $Mg(OH)_2$ care înglobează proteinele şi săpunurile

acizilor graşi şi absoarbe pigmenţii existenţi în ser.

Conţinutul eprubetelor se centrifughează 15 minute la 3000 rot./min.

Dozarea glicerolului. Supernatantul clar, incolor şi deproteinizat, obţinut după centrifugare conţine glicerolul eliberat prin saponificarea trigliceridelor din ser(probă) şi tripalmitină (standard) şi glicerolul existent liber în ser(martor).

In eprubete obişnuite, la 1 ml supernatant din fiecare eprubetă de centrifugă se adaugă 1 ml soluţie de acid sulfuric 2N şi 0,2 ml soluţie de metaperiodat de sodiu. Se agită şi se lasă în repaus la întuneric timp de 10 minute.

Reacţia de culoare. In fiecare eprubetă se măsoară cîte 0,5 ml soluţie de clorhidrat de fenilhidrazină, se agită şi se lasă la întuneric timp de 10 minute. Se dezvoltă o culoare specifică care se intensifică şi se stabilizează la adăugarea a 2 ml soluţie de HCl 5N.

După 15 minute(pînă la maximum 30 minute) de la adăugarea soluţiei de HCl se determină extincţiile probei, standardului şi mortorului la 530 nm(filtru verde) faţă de controlul reactivilor (proba cu apă distilată).

Calcularea rezultatelor. Pentru a determina cantitatea de gliceride se scade extincţia martorului(glicerol liber) din extincţia probei. Deci :

$$\text{mg trigliceride/100 ml ser} = \frac{E_p - E_m}{E_s} \cdot 100 \quad ,$$

unde: E_p -extincţia probei ;

E_m -extincţia martorului(glicerolului liber);

E_s -extincţia standardului.

Calculul se poate efectua raportînd extincţiile probei şi martorului la o curbă de etalonare realizată cu o soluţie cloroformică de tripalmitină în concentraţia de 100 mg/100 ml, procedînd în acelaşi mod ca şi cu probele de cercetat.

Observaţie. Legea lui Lambert-Beer se aplică pentru concentraţii ale trigliceridelor între 0 şi 250 mg%. In cazul serurilor hiperlipemice lactescente este recomandabil ca acestea să se dilueze(1:1) cu ser fiziologic.

Semnificaţie practică. Valorile fiziologic normale sînt cuprinse între 40-150 mg%.

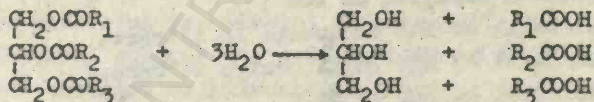
Concentraţia trigliceridelor serice(hipertrigliceridemia) creşte în hiperlipemia esenţială şi hiperlipoproteinemia primară(familială). Se consideră că dozarea trigliceridelor este unul din indicatorii principali pentru precizarea diagnosticului diferitelor tipuri de anomalii congenitale ale metabolismului lipidic.

Creşterea simptomatică a nivelului trigliceridelor se observă în graviditate, diabet, pancreatită, sindromul nefrotic, hipotiroidie, infiltraţie grasă şi alte afecţiuni ale ficatului, ateroscleroză etc.

9.2.3. DETERMINAREA INDICELUI DE SAPONIFICARE

Indicele de saponificare reprezintă numărul de mg de hidroxid de potasiu necesare pentru neutralizarea acizilor graşi liberi şi esterificaţi prezenţi într-un gram de grăsime.

Principiul metodei. O anumită cantitate, exact cîntărită, de grăsime se fierbe cu un volum cunoscut de soluţie de KOH titrată. In aceste condiţii are loc hidroliza sau saponificarea grăsimii cu formarea glicerinei şi acizilor graşi respectivi :



$$\begin{array}{l} CH_2OCOR_1 \\ CHOCOR_2 \\ CH_2OCOR_3 \end{array} + 3H_2O \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2OH \\ CHOH \\ CH_2OH \end{array} + \begin{array}{l} R_1COOH \\ R_2COOH \\ R_3COOH \end{array}$$

Acizii graşi ai grăsimii, eliberaţi în urma acestei hidrolize, neutralizează o parte din hidroxidul de potasiu :



$$RCOOH + KOH \longrightarrow RCOOK + H_2O$$

După aceeaşi ecuaţie, reacţionează şi acizii graşi liberi existenţi în grăsimea analizată.

Excesul de KOH, care nu a reacţionat cu acizii graşi, se retitrează cu o soluţie de acid clorhidric :



$$KOH + HCl \longrightarrow KCl + H_2O$$

Din diferenţa dintre cantitatea iniţială de alcali şi cea titrată după hidroliza probei de grăsime se calculează indicele de

saponificare.

<u>Reactivi</u>.1.Soluţie de hidroxid de potasiu N/2 în alcool etilic 96%.Se dizolvă 30 g de KOH într-o cantitate minimă de apă distilată.Se adaugă alcool etilic pur de 96% pînă la 1000 ml.Se lasă în repaus trei zile pentru a se depune carbonatul de potasiu.Se filtrează şi apoi se stabileşte factorul soluţiei folosind acidul oxalic.

Soluţia de KOH N/2 se păstrează în flacon brun,închis bine (pentru a se apăra de dioxidul de carbon din aer).

2.Soluţie de acid clorhidric N/2.Intr-un balon cotat de 1000 ml se măsoară 45 ml de HCl concentrat(35-37%) şi se completează la semn cu apă distilată.

Stabilirea factorului soluţiei de HCl se face prin titrare cu soluţie de KOH N/2.Cu ajutorul unei biurete se măsoară 20-25 ml soluţie de HCl N/2 într-un pahar Berzelius şi se titrează la rece,în prezenţa fenolftaleinei,pînă se obţine culoarea slab roz, cu soluţie de KOH N/2.Normalitatea soluţiei de HCl se calculează după formula :

$$T = \frac{T_1 \cdot n_1}{n} ,$$

unde T_1 -normalitatea soluţiei de KOH ;
n_1 -numărul de ml de KOH consumaţi la titrare;
n -numărul de ml de HCl luaţi pentru titrare.;

Factorul soluţiei de HCl va fi :

$$F = \frac{\text{normalitatea practică}}{\text{normalitatea teoretică}} = \frac{T}{0,5}$$

3.Soluţie de fenolftaleină 1%.Se dizolvă 1 g de fenolftaleină în 100 ml de alcool etilic 96%.

<u>Modul de lucru</u>.Intr-un flacon conic uscat cu capacitatea de 150-200 ml se cîntăresc la balanţa analitică 1-2 g de grăsime.In flacon se introduc cu ajutorul unei biurete exáct(!) 25 ml soluţie de hidroxid de potasiu N/2.

Intrucît normalitatea soluţiei de KOH poate să se modifice, pe de o parte,datorită faptului că alcoolul etilic este parţial oxidat,iar pe de altă parte,datorită formării de bicarbonaţi,

pentru obţinerea de rezultate corecte este necesară verificarea normalităţii soluţiei de KOH. In acest scop paralel se efectuează o probă de control(martor). Pentru aceasta într-un flacon conic se introduc în loc de grăsime 2 ml de apă distilată şi se adaugă 25 ml soluţie de hidroxid de potasiu N/2.

Flacoanele se montează la refrigerente ascendente şi se fierb timp de 30 minute pe o baie de apă, agitînd cu intermitenţă. Saponificarea se consideră terminată, cînd lichidul din flacoane devine clar şi omogen, fără urme de grăsime.

După terminarea saponificării, în flacoane se adaugă 2-3 picături de soluţie de fenolftaleină şi se titrează la cald excesul de KOH cu soluţie de acid clorhidric N/2 pînă la dispariţia coloraţiei roz a conţinutului flacoanelor.

<u>Calculul rezultatelor</u>. Un ml soluţie de acid clorhidric exact N/2 corespunde la 28,055 mg de hidroxid de potasiu.

Indicele de saponificare(I.S.) se calculează după formula :

$$I.S. = \frac{(V-v).F.28,055}{a},$$

unde: V -ml soluţie de acid clorhidric N/2 necesari pentru titrarea probei de control;
v -ml soluţie de acid clorhidric N/2 necesari pentru titrarea excesului de hidroxid de potasiu în proba cu grăsime;
F -factorul soluţiei de acid clorhidric stabilit cu ajutorul soluţiei de hidroxid de potasiu;
a -cantitatea de grăsime luată pentru analiză.

<u>Importanţa practică</u>. Indicele de saponificare caracterizează greutatea moleculară a acizilor graşi care intră în compoziţia grăsimilor. El este invers proporţional cu greutatea moleculară a acizilor graşi din compoziţia trigliceridelor. Un indice de saponificare mare dovedeşte prezenţa unor acizi graşi cu greutate moleculară mică. Astfel, untul are indicele de saponificare în jurul cifrei 226, iar grăsimea din nuca de cocos 245-246. Un indice de saponificare mic arată prezenţa unor acizi cu greutate moleculară mare. De exemplu, la uleiul de rapiţă, indicele de saponificare este 172-174.

Indicele de saponificare este de asemenea dependent de pre-

zenţa substanţelor nesaponificabile,care scad valoarea indicelui, precum şi de existenţa acizilor graşi liberi în grăsimea analizată,aceştia mărind valoarea indicelui.

In fabricarea săpunurilor,indicele de saponificare este utilizat pentru cunoaşterea purităţii şi naturii grăsimilor folosite şi pentru calcularea cantităţii de sodă caustică necesară procesului de saponificare,controlîndu-se,în acest mod,utilizarea raţională a materiilor prime.

9.2.4.DETERMINAREA INDICELUI DE IOD

Indice de iod se numeşte cantitatea de iod,exprimată în grame,care este adiţionată la legăturile duble ale acizilor graşi nesaturaţi din 100 g grăsime.Noţiunea de "indice de iod" este convenţională,deoarece nici într-o metodă de determinare a indicelui de iod nu se adiţionează iodul ca atare la legăturile duble.In principalele metode se adiţionează ICl,BrI,HOI,Br_2.Indiferent de natura compusului halogenat folosit,se calculează cantitatea de iod,exprimată în grame,echivalentă cantităţii de halogen adiţionat de 100 g de grăsime.

9.2.4.1.DETERMINAREA INDICELUI DE IOD DUPA HANUS

Principiul metodei.Prin amestecarea soluţiei de iod în acid acetic glacial cu bromul ia naştere bromura de iod.Grăsimea dizolvată în cloroform este tratată la întuneric un anumit interval de timp cu un exces de soluţie acetică de bromură de iod.In aceste condiţii,bromura de iod se adiţionează cantitativ la legăturile duble ale acizilor graşi nesaturaţi din compoziţia grăsimii respective :



$$RCH = CHR_1 \;+\; BrI \longrightarrow \underset{I}{RCH} - \underset{Br}{CHR_1}$$

Excesul de bromură de iod este descompus de IK care se adaugă după ce probele au stat la întuneric :



$$BrI \;+\; KI \longrightarrow KBr \;+\; I_2$$

Iodul rezultat se titrează cu o soluţie de tiosulfat :



$$I_2 \;+\; 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow Na_2S_4O_6 \;+\; 2NaI$$

Reactivi.1.Cloroform p.a.

2.Soluţie Hanus: 3,25 g de iod metalic se dizolvă în 25 ml de acid acetic glacial într-un balon cotat de 250 ml.In soluţie obţinută se adaugă 2,05 g de brom şi se completează volumul cu acid acetic glacial la semn.Reactivul se păstrează la întuneric în flacon cu dop şlefuit.

3.Soluţie de iodură de potasiu 10%.

4.Soluţie de amidon 1%.

5.Soluţie de tiosulfat de sodiu N/10.Intr-un balon cotat de 1000 ml,se dizolvă 25 g de tiosulfat de sodiu în 700 ml de apă distilată,în prealabil fiartă bine pentru îndepărtarea CO_2.In vederea conservării se adaugă 0,1 g de carbonat de sodiu şi se completează la semn,tot cu apă distilată fiartă.După ce soluţia se lasă în repaus 2-3 zile,se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat cu ajutorul dicromatului de potasiu.Se dizolvă 0,3866 g de dicromat de potasiu în 100 ml apă distilată.Intr-un flacon conic se măsoară 20 ml soluţie de dicromat de potasiu,10 ml soluţie de KI 10%,5 ml HCl concentrat şi iodul rezultat se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu N/10,în prezenţa amidonului ca indicator.Apoi se calculează factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu N/10.

Modul de lucru.Se cîntăreşte 0,2-0,4 g de ulei sau 0,8-1,0g de grăsime solidă într-o fiolă de cîntărire,în care se găseşte şi o mică pipetă.Cu ajutorul pipetei se trece uleiul cîntărit într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml uscat,prevăzut cu dop şlefuit şi apoi se recîntăreşte fiola cu pipetă cu tot.Diferenţa dintre cele două cîntăriri reprezintă cantitatea de ulei luată pentru determinare.Picăturile de ulei nu trebuie să cadă pe pereţii şi gîtul flaconului.Se adaugă 10 ml de cloroform.

Intr-un alt flacon conic care va servi de control,se introduc numai 10 ml de cloroform.

Apoi,în ambele flacoane se adaugă din biuretă exact cîte 15-25 ml de soluţie Hanus(reactiv 2) şi flacoanele se închid perfect.Conţinutul flacoanelor se agită cu atenţie şi se lasă la întuneric,la temperatura de 25-30°C timp de 1 oră sau la temperatura camerei pînă la două ore.

După scurgerea acestui interval de timp, se adaugă în fiecare flacon 15 ml soluție de iodură de potasiu 10% și 50 ml de apă distilată. Conținutul flacoanelor se agită puternic și se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu N/10 pînă la apariția unei colorații galben-portocalii. Apoi, se adaugă în flacoane 2-3 picături de soluție de amidon 1% și probele sînt titrate cu tiosulfat, agitînd puternic, pînă la dispariția completă a colorației albastre.

Calculul rezultatelor. La 1 ml soluție de tiosulfat de sodiu exact N/10 corespund 0,0127 g de iod.

Indicele de iod (I.I.) se calculează după următoarea formulă:

$$I.I. = \frac{(V - v).F.0,0127.100}{G},$$

unde: V - volumul soluției de tiosulfat de sodiu N/10 utilizat pentru titrarea probei de control, în ml ;

v - volumul soluției de tiosulfat de sodiu N/10 consumat la titrarea probei cu ulei, în ml ;

F - factorul de corecție al soluției de tiosulfat de sodiu ;

G - cantitatea de ulei cîntărit, în g ;

9.2.4.2. METODA RAPIDA DE DETERMINARE A INDICELUI DE IOD

Principiul metodei. Metoda se bazează pe proprietatea iodului de a reacționa cu apa după ecuația :



$$I_2 + H_2O \longrightarrow HI + HOI$$

In condiții obișnuite această reacție nu are loc, dar în prezența combinațiilor nesaturate, care adiționează acidul hipoiodos, reacția indicată decurge cantitativ :



$$RCH = CHR_1 + HOI \longrightarrow \underset{OH}{RCH} - \underset{I}{CHR_1}$$

Reactivi. 1. Soluție de iod N/5. Se introduc 6,35 g de iod metalic într-un balon cotat de 250 ml și după ce se dizolvă în alcool, se completează la semn tot cu același solvent.

2. Soluție de tiosulfat de sodiu N/10 (pag.165).

3. Soluție de amidon 1%.

Modul de lucru. Intr-un flacon de reactivi uscat cu dop rodat sau într-un flacon Erlenmeyer cu dop rodat(cu capacitatea de 500 ml) se introduc 0,2-0,3 g de ulei(2-3 picături),cîntărite la balanţa analitică în modul indicat la metoda Hanus şi se adaugă 30 ml de alcool pentru dizolvarea materialului(dacă este necesar, se poate încălzi pe baia de apă).Apoi se măsoară cu o pipetă Mohr 25 ml soluţie de iod N/5,se adaugă 200 ml de apă distilată şi se agită puternic(închizînd cu dopul).După ce flaconul se lasă în repaus 5 minute,se titrează conţinutul cu soluţie de tiosulfat de sodiu N/10.Mai departe se procedează ca la metoda descrisă anterior.Paralel se efectuează o probă de control şi se calculează rezultatele după formula dată mai sus.

Importanţa practică. Indicele de iod este una dintre constantele chimice cele mai importante pentru uleiuri(grăsimi),întrucît el arată conţinutul de acizi graşi nesaturaţi într-un ulei dat şi permite să se aprecieze gradul de nesaturare al uleiului (grăsimii),tendinţa lui spre sicativitate,rîncezire şi alte schimbări,care se produc în timpul păstrării şi prelucrării uleiurilor comestibile şi tehnice sau a produselor alimentare bogate în grăsimi.

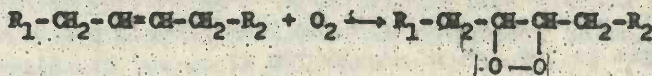
Pentru un ulei proaspăt indicele de iod este o constantă caracteristică,care determină provenienţa lui.După valoarea indicelui de iod,uleiurile naturale se împart în: sicative,semisicative şi nesicative.Uleiurile sicative au un indice de iod de peste 130(indicele de iod al uleiului de in este 170-180).Uleiurile semisicative au un indice de iod cuprins între 95-130(uleiul de floarea soarelui cu indicele de iod 127-136).Uleiurile nesicative au indici de iod sub 90(uleiul de măsline are indicele de iod 75-88).Grăsimile animalelor terestre au un indice de iod mai mic,în general sub 80,iar cele ale animalelor marine au indici cuprinşi între 100-170.

Determinarea indicelui de iod se practică curent în industria uşoară şi alimentară pentru aprecierea naturii şi purităţii grăsimilor sau uleiurilor.Indicele de iod este folosit de asemenea pentru calcularea cantităţii de hidrogen necesară hidrogenării acizilor graşi nesaturaţi prezenţi în uleiuri,în cazul cînd

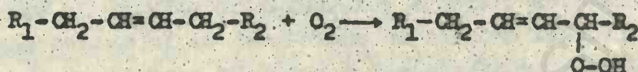
păstrarea sau transportul acestora reclamă solidificarea lor.

9.2.5. DETERMINAREA INDICELUI PEROXIDIC

In prezenţa oxigenului atmosferic acizii graşi din compoziţia grăsimilor se pot oxida parţial cu formare de peroxizi.



Peroxid organic

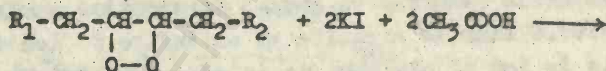


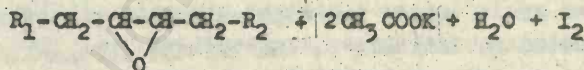
Hidroperoxid

Formarea peroxizilor şi hidroperoxizilor se observă în procesul de rîncezire a grăsimilor, de asemenea în timpul uscării lor. In acest mod, indicele peroxidic serveşte ca indicator al schimbărilor oxidative suferite de grăsimi.

De obicei indicele peroxidic se exprimă în grame de iod care pot să reacţioneze cu peroxizii conţinuţi în 100 g grăsime.

Principiul metodei. Determinarea indicelui peroxidic se bazează pe proprietatea peroxidului grăsimii de a reacţiona în mediu acid cu iodura de potasiu, eliberînd iodul. Schematic această reacţie se poate reda astfel :





Iodul eliberat se titrează cu tiosulfat :



$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

După cantitatea tiosulfatului consumat pentru fixarea iodului eliberat, se calculează indicele peroxidic.

Reactivi. 1. Cloroform.

2. Acid acetic glacial.

3.Soluţie saturată de KI.Se prepară în momentul utilizării.
4.Soluţie de amidon 1%.
5.Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,01 N.

Modul de lucru.Intr-un flacon conic de 100-150 ml se cîntăreşte la balanţa analitică 1 g de grăsime,cu o exactitate la a patra zecimală.Intr-un alt flacon(control) se măsoară 2 ml apă. In ambele flacoane se adaugă cu un cilindru cîte 10 ml cloroform şi se agită pînă la dizolvarea grăsimii.Apoi se măsoară în fiecare flacon cîte 15 ml acid acetic glacial(cu un cilindru) şi 1 ml soluţie de iodură de potasiu(cu o pipetă).

Conţinutul flacoanelor se agită şi se lasă la întuneric.

După 3 minute se titrează iodul eliberat cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,01 N.Titrarea se continuă pînă la culoarea galben,se pipetează în fiecare flacon 1 ml soluţie de amidon şi se titrează pînă la dispariţia culorii albastre.

Calculul rezultatelor. Indicele peroxidic al grăsimii cercetate se calculează cu ajutorul formulei :

$$I.P. = \frac{(V - v).F.0,00127.100}{G}$$

unde : V -ml soluţie de tiosulfat 0,01 N consumaţi la titrarea probei cu grăsime ;
v -ml soluţie de tiosulfat 0,01 N consumaţi pentru control;
F -factorul soluţiei de tiosulfat;
0,00127-cantitatea gramelor de iod echivalentă pentru 1 ml soluţie de tiosulfat exact 0,01 N;
G -greutatea grăsimii analizate.

Aprecierea gradului de alterare oxidativă a grăsimii în funcţie de valoarea indicelui peroxidic este dată mai jos :

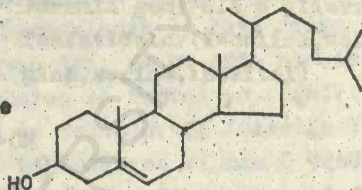
Indice peroxidic,% I	Gradul de alterare
Mai mic de 0,03	Grăsime proaspătă
0,03 - 0,06	Grăsime proaspătă,însă nu se pretează la păstrare.
0,06 - 0,10	Grăsime cu prospeţime dubioasă.
Mai mare de 0,1	Grăsime alterată

9.3. ANALIZA STERIDELOR

Steridele constituie esteri ai sterolilor cu diferiţi acizi graşi superiori.

Intre sterolii existenţi în organismul omului şi animalelor superioare pe primul loc se situează colesterolul.

Colesterolul este un alcool monoatomic secundar, nesaturat, derivat de la ciclopentanoperhidrofenantren (steran).



Colesterol

Colesterolul se găseşte în toate ţesuturile şi lichidele organismului animal atît în stare liberă cît şi sub formă esterificată, aceasta din urmă intrînd în alcătuirea membranelor celulare. O cantitate mare de colesterol se descoperă în ţesutul nervos, corticosuprarenale, glandele sexuale, bilă, ficat, muşchi, sînge etc.

Variaţia concentraţiei colesterolului în sînge depinde de starea fiziologică a organismului. O creştere temporară a conţinutului de colesterol în sînge poate să survină şi prin introducerea cu hrana a unor produse bogate în colesterol (gălbenuş de ou, creier, ficat, rinichi, ulei de măsline).

Colesterolul liber şi esterificat alcătuiesc fracţiunea colesterolului total.

Dintre toţi componenţii spectrului lipidic al serului sanguin, cel mai mare interes prezintă determinarea conţinutului de colesterol total şi esterificat în sînge.

9.3.1. DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL IN SERUL SANGUIN PRIN METODA BAZATA PE REACTIA LIEBERMAN-BURCHARD

Principiul metodei. Colesterolul formează cu anhidrida acetică, în prezenţa amestecului de acid acetic şi acid sulfuric, produşi coloraţi final în verde care pot fi determinaţi

fotometric.

Reactivi.1.Reactiv de culoare.Se obţine prin amestecarea unui volum de acid acetic glacial,a 5 volume de anhidridă acetică şi a unui volum de acid sulfuric concentrat.Intrucît reacţia are loc cu degajare de căldură,flaconul,în care se realizează amestecul,se răceşte constant,iar acidul sulfuric se adaugă ultimul,foarte încet,picătură cu picătură,sub agitare continuă.Amestecul obţinut trebuie să fie transparent,clar sau cu o uşoară tentă de galben.Se păstrează în sticlă brună cu dop rodat şi la frigider.

2.Soluţie standard de colesterol 180 mg%.Se dizolvă 180 mg colesterol în 2,5 ml cloroform şi se completează la 100 ml cu alcool etilic absolut.Această soluţie nu este stabilă.

Modul de lucru.In două eprubete obişnuite se măsoară cîte 2,1 ml reactiv de culoare(reactiv 1).In prima eprubetă se adaugă cu atenţie,foarte încet,pe peretele ei 0,1 ml ser nehemolizat.In cealaltă eprubetă se pipetează în aceleaşi condiţii 0,1 ml soluţie etalon.Conţinutul eprubetelor se agită energic prin scuturarea lor de 10-12 ori.Se termostatează timp de 20 minute la 37°C. Apoi se colorimetrează la 630-660 nm(filtru roşu) faţă de reactivul 1.

Calculul rezultatelor.Conţinutul de colesterol total în 100 ml ser se calculează după formula :

$$\text{mg colesterol total/100 ml ser} = \frac{E_p}{E_s} \cdot 180$$

unde : E_p - extincţia probei cu ser şi
E_s - extincţia probei etalon(standard).

Observaţii.1.Toate eprubetele şi pipetele trebuie să fie perfect curate şi uscate.

2.Serul sanguin nu trebuie să posede urme de hemoliză.

3.Serul trebuie să se adauge foarte încet,pe peretele eprubetei,altfel apare o culoare galbenă şi în legătură cu aceasta se obţin valori mai crescute ale extincţiilor.

9.3.2. MICROMETODA DE DETERMINARE DIRECTA A COLESTEROLULUI LIBER SI TOTAL IN SERUL SANGUIN

Principiul metodei de dozare separată a colesterolului liber şi total se bazează pe interacţiunea clorurii ferice în amestec de acid acetic şi acid sulfuric cu colesterolul din una şi aceeaşi probă de ser sanguin în condiţii diferite de temperatură.

Reactivi. 1. Reactiv de culoare. Mai întîi se prepară soluţia de clorură ferică ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0,1% în acid acetic glacial. La 3 volume din soluţia de clorură ferică se adaugă 2 volume de acid sulfuric concentrat. Amestecul obţinut se răceşte la temperatura camerei. Se păstrează în sticlă cu dop rodat.

2. Soluţie standard de colesterol 200 mg%. Se dizolvă 50 mg de colesterol în 25 ml acid acetic glacial, la balon cotat.

Modul de lucru. Metoda cuprinde două etape: la început se dozează colesterolul liber şi apoi suma colesterolului liber şi esterificat.

In două eprubete obişnuite curate se introduc cîte 2 ml reactiv de culoare (reactiv 1). Apoi cu o micropipetă se toarnă pe peretele uneia din eprubete 0,02(0,04) ml ser sau plasmă sanguină (fără urme de hemoliză!). In cealaltă eprubetă se adaugă în mod similar 0,02(0,04) ml soluţie standard de colesterol. Conţinutul eprubetelor se agită şi se lasă în repaus timp de 60 minute la +20° C(!). Măsurarea extincţiei se realizează la 560 nm (filtru verde) faţă de reactivul de culoare.

După citirea extincţiei colesterolului liber amestecul de reacţie se foloseşte pentru determinarea ulterioară.

Eprubetele se introduc într-o baie de apă la fierbere exact pentru 60 secunde. Eprubetele se răcesc la temperatura camerei şi se determină extincţia probelor la fotoelectrocolorimetru în mod analog.

Calculul rezultatelor. Calculul se efectuează conform următoarei formule :

$$\text{mg colesterol liber(total)/100 ml ser} = \frac{E_c}{E_s} \cdot 200 ,$$

unde: E_c-extincţia probei de cercetat cu colesterol liber(total);
E_s-extincţia probei standard.

Insemnătatea clinico-diagnostică. In sîngele adultului normal cantitatea colesterolului total(colesterolemia) variază între 150-250 mg%, iar a colesterolului liber între 40-90 mg%(reprezentînd aproximativ 1/3 din colesterolul total). O variaţie fiziologică a colesterolului se observă în funcţie de vîrstă, sex, rasă, alimentaţie, echilibru neuroendocrin, profesie.

Cea mai mare parte a colesterolului seric este de origine endogenă, aportul de colesterol exogen influenţînd în mică măsură colesterolemia.

Creşterea concentraţiei colesterolului în sînge(hipercolesterolemia) se întîlneşte în tulburări ale metabolismului lipidic, în ateroscleroză, icter obstructiv, sindrom nefrotic, hipotiroidie, avitaminoze B, diabet zaharat, intoxicaţii acute cu diferite substanţe, pancreatite.

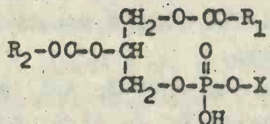
Scăderea concentraţiei colesterolului(hipocolesterolemie) se descoperă în anemii, tuberculoză, hipertiroidie, înfometare, hepatite acute, hepatite cronice, ciroze, lezarea sistemului nervos central.

Starea sistemului endocrin al organismului manifestă o influenţă esenţială asupra nivelului colesterolului în sînge. Astfel introducerea insulinei produce scăderea colesterolului. Acţiune similară are şi hormonul glandei tiroide: în hipotiroidism se observă hipercolesterolemia.

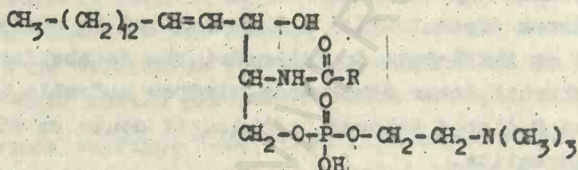
Determinarea diferitelor fracţiuni de colesterol(total, liber şi esterificat) în serul sanguin lărgeşte considerabil posibilităţile diagnostice de cercetare a metabolismului lipidic. Se estimează că stabilirea coeficientului de esterificare, adică a raportului între colesterolul esterificat şi colesterolul total (normal are valoarea 0,6-0,8) serveşte ca o probă funcţională însemnată a ficatului, în care are loc formarea colesteridelor. Acest raport se micşorează odată cu apariţia celor mai vagi simptome de patologie a ficatului.

9.4. DETERMINAREA FOSFOLIPIDELOR

Fosfolipidele(fosfatidele) alcătuiesc o grupă de lipide complexe,conţinînd pe lîngă acidul fosforic,un alcool,acizi graşi superiori şi baze azotate.După natura alcoolului fosfatidele se împart în glicerofosfatide şi sfingofosfatide(sfingomieline):



Formula generală a glicerofosfatidelor(X=colină,colamină,serină,inozitol)



Sfingofosfatidă

Concentraţia totală a fosfolipidelor de obicei se apreciază după conţinutul lor în fosfor lipidic,căruia îi revin 4% din masa moleculară a fosfatidelor.De aceea,înmulţind cantitatea de fosfor lipidic găsită în urma analizei cu 25,se află conţinutul fosfolipidelor totale.

Fosforul lipidic poate fi determinat,fie în extractul lipidic,fie după precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic.In ultimul caz împreună cu proteinele precipită şi fosfolipidele. Precipitatul obţinut se foloseşte pentru dozarea fosforului.

Dozarea lipidelor totale în serul sanguin după conţinutul lor în fosfor

Principiul metodei.Fosfolipidele sînt precipitate cu acid tricloracetic(împreună cu proteinele serice).După mineralizarea precipitatului obţinut,se dozează colorimetric fosforul prin determinarea intensităţii culorii albastre pe care o dă cu molibdatul de amoniu,în mediu reducător.

Reactivi.1.Soluţie de acid tricloracetic 10%.

2.Soluţie de acid percloric($HClO_4$) 57%.Se poate lucra cu soluţie de oricare altă concentraţie apropiată de $HClO_4$.

3.Soluţie de molibdat de amoniu 4%.Se dizolvă 4 g de molibdat de amoniu în 100 ml apă distilată.Soluţia păstrată la rece este stabilă cîteva săptămîni.

4.Soluţie stoc de acid 1-amino-2-naftol-4-sulfonic(eiconogen).In 100-150 ml apă distilată se dizolvă 30 g bisulfit de sodiu($NaHSO_3$),după care se adaugă 0,5 g eiconogen.Soluţia se agită cu o baghetă de sticlă pînă la dizolvarea completă a eiconogenului.Separat într-un volum nu prea mare de apă se dizolvă 6g sulfit de sodiu anhidru(Na_2SO_3).Cele două soluţii se amestecă şi se completează volumul cu apă distilată la 250 ml.Peste 2-3 ore soluţia se filtrează.Se păstrează în frigider şi în sticlă de culoare închisă.Reactivul este stabil timp de 30 zile.Inainte de întrebuinţare 10 ml soluţie stoc se diluează cu apă distilată de 2,5 ori.In lipsa eiconogenului ca agent reducător se poate utiliza o soluţie 1% de acid ascorbic(se prepară înainte de utilizare) sau o soluţie 1% de hidrochinonă.

5.Soluţie stoc de fosfat monopotasic.Se dizolvă 4,39g KH_2PO_4,uscat pînă la pondere constantă la temperatura de 120°C, în 1000 ml apă distilată,adăugîndu-se cîteva picături de cloroform pentru conservare.Se păstrează în frigider.

Un ml din soluţia obţinută conţine 1 mg P.

6.Soluţie etalon de fosfat monopotasic.Soluţia stoc de fosfat monopotasic se diluează de 100 ori,în momentul întrebuinţării.Intr-un ml soluţie etalon se găsesc 0,01 mg fosfor.

Modul de lucru.Intr-o eprubetă de centrifugă conţinînd 3 ml apă distilată se pipetează 0,2 ml ser sanguin.Se adaugă 3 ml soluţie de acid tricloracetic(primii 1,5 ml cu picătura,agitînd eprubeta,restul mai repede).Se lasă în repaus 2 minute,după care se centrifughează timp de 15 minute,la 3000 rot./min.Supernatantul se aruncă şi se răstoarnă eprubeta pe o bucată de hîrtie de filtru pînă curge tot lichidul.

In eprubeta cu precipitatul separat se introduc 1 ml soluţie de acid percloric 57% şi 1-2 perle de sticlă pentru fierbere uniformă.Eprubeta se încălzeşte pe o baie de nisip electrică

(temperatura 180° C) sau într-o foaie de asbest pe un reşou electric pînă la decolorarea soluţiei.Se recomandă ca eprubeta să se introducă în baia de nisip rece şi apoi să se încălzească; astfel se va evita spargerea eprubetei.De asemenea,se va urmări operaţia de încălzire pînă nu se vor mai forma bule.Mineralizarea completă durează aproximativ o oră.

După mineralizare,în eprubetă se adaugă imediat 5 ml apă distilată.

In timpul mineralizării probei se pregăteşte un control pentru reactivi,conţinînd 0,8 ml acid percloric 57% şi trei probe etalon alcătuite din cîte 0,8 ml acid percloric 57% şi 2 ml soluţie etalon de fosfat. Controlul şi probele etalon se completează la 6 ml cu apă distilată.

In fiecare eprubetă(probă de cercetat,control şi trei probe etalon) se pipetează cîte 1 ml soluţie de molibdat de amoniu 4%, se agită şi se adaugă cîte 1 ml soluţie diluată de eiconogen, completînd volumul la 10 ml cu apă distilată.Conţinutul eprubetelor se agită şi se lasă în repaus.

După 20 minute se determină extincţia probelor la 700 nm (filtru roşu) faţă de control.

Calculul rezultatelor. Concentraţia de fosfor lipidic,în mg/100 ml ser sanguin,este dată de relaţia :

$$mg\% = \frac{E_{cer}}{E_{et}} \cdot \frac{0,02 \cdot 100}{0,2} ,$$

unde : E_{cer} - extincţia probei de cercetat ;
E_{et} - media extincţiilor celor trei probe etalon ;
0,02 - cantitatea mg de fosfor din 2 ml soluţie etalon;
0,2 - volumul serului sau plasmei,ml.

Inmulţind concentraţia fosforului lipidic cu 25, se obţine conţinutul de fosfolipide :

$$mg\ fosfolipide\ totale/100\ ml = \frac{E_{cer}}{E_{et}} \cdot \frac{0,02 \cdot 100 \cdot 25}{0,2}$$

Importanţa practică. La adulţii sănătoşi concentraţia fosforului lipidic este egală cu 6,1-14,5 mg%(media 9,2 mg%).

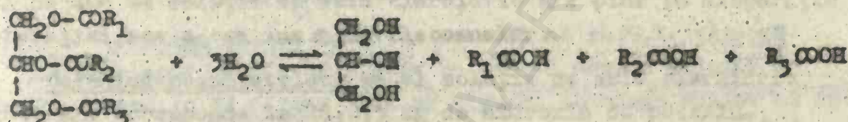
Creşterea nivelului de fosfolipide în serul sanguin se

observă în diabetul zaharat,nefroze,nefrite cronice,hiperlipemie esențială,anemii posthemoragice,ciroză biliară,obstrucție biliară.

Scăderea conținutului de fosfolipide se întîlnește în ateroscleroză,distrofie alimentară etc.

9.5.DETERMINAREA ACTIVITATII LIPAZEI

Lipaza(hidrolaza esterilor glicerinei,EC 3.1.1.3) catalizează scindarea hidrolitică a grăsimilor în glicerină și acizi grași liberi după schema :



$$\begin{array}{l} CH_2O-COR_1 \\ | \\ CHO-COR_2 \\ | \\ CH_2O-COR_3 \end{array} + 3H_2O \rightleftharpoons \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + R_1COOH + R_2COOH + R_3COOH$$

unde R_1,R_2 și R_3 reprezintă radicali de acizi grași superiori.

Lipazele se întîlnesc în diferite țesuturi animale :ficat, pancreas,plămîni,rinichi,țesuturile grase,sînge etc.In regnul vegetal lipazele sînt larg răspîndite.In cantitate mai mare lipazele se găsesc în semințe,în special în semințele plantelor oleaginoase.Lipazele s-au identificat,de asemenea,în cîteva microorganisme.Dintre lipazele de origine animală cea mai bine studiată este lipaza din pancreasul de porc,iar dintre cele de origine vegetală lipaza din boabele de ricin.

Activitatea catalitică a lipazelor de diverse proveniențe este diferită.Aceste enzime se deosebesc,de asemenea,după pH-ul optim de acțiune,temperatura optimă și o serie de alte proprietăți.

Determinarea activității lipazei vegetale.

In plante există lipaze care acționează la diferite valori de pH,deosebindu-se în acest sens lipaze acide,neutre și alcaline,care manifestă maximum de activitate în mediu acid,neutru, respectiv alcalin.

Semințele culturilor oleaginoase conțin mai ales lipaze acide și alcaline.

<u>Principiul metodei</u>.Activitatea lipazelor se determină după creşterea acidităţii în mediul de reacţie în urma eliberării acizilor graşi din grăsimi.Acizii graşi liberi,formaţi prin hidroliza grăsimii sub acţiunea lipazelor se titrează direct cu soluţie de hidroxid alcalin :



$$R\text{-}COOH + NaOH \longrightarrow R\text{-}COONa + H_2O$$

Substratul ideal pentru studiul acţiunii lipazei dintr-un anumit obiect biologic ar fi grăsimea obţinută din acel obiect. Insă,în calitate de substrat pentru lipaze se pot utiliza şi grăsimi sau uleiuri naturale de alte provenienţe.

<u>Reactivi</u>.1.Ulei de floarea soarelui sau de măsline.

2.Soluţie tampon acetat cu pH 4,7.Se obţine prin amestecarea de volume egale de soluţie de acid acetic 1N şi acetat de sodiu 1 N cu 2 volume de apă.

3.Soluţie tampon borat 0,2 M cu pH 8,5.

4.Soluţie de NaOH 0,1 N.

5.Soluţie alcoolică de timolftaleină 1%.

6.Alcool etilic.

7.Eter etilic

8.Toluen

<u>Modul de lucru</u>.Seminţele de plante se macină sau se triturează în mojar(fără nisip).O cantitate de 2,5 g de seminţe se mojarează cu 1 ml ulei pur de floarea soarelui.Pentru determinarea activităţii lipazelor acide în mojar se adaugă 5 ml soluţie tampon acetat cu pH 4,7,iar pentru determinarea lipazelor alcaline se folosesc 5 ml soluţie tampon borat cu pH 8,5 şi se triturează timp de 5-10 minute conţinutul mojarelor.

La terminarea triturării pasta din mojare se transferă în două flacoane conice cu dop rodat,avînd capacitatea de 100 ml.Mojarele se spală cu 5 ml apă distilată,care se adaugă în flacoane. Se introduc 5 picături de toluen,se închid flacoanele cu dopuri şi se agită cu atenţie la un agitator automat,timp de 3-5 minute. Apoi flacoanele se introduc timp de 20-24 ore,în termostat la 30°.

După termostatare,în fiecare flacon se toarnă cîte 50 ml amestec de alcool etilic cu eter etilic(4:1) şi se agită.

Se lasă să se depună reziduul insolubil şi se titrează cu soluţie de NaOH 0,1 N,în prezenţa cîtorva picături de timolftaleină.

Paralel cu probele de cercetat se execută şi două probe martor.Se cîntăresc două eşantioane de material de analizat şi se procedează cu ele în acelaşi mod,ca şi cu probele de cercetat, numai că martorii nu se mai incubează ci se titrează imediat.

Calculul rezultatelor.Activitatea lipazei se exprimă în ml soluţie de NaOH 0,1 N necesari pentru neutralizarea acizilor graşi eliberaţi prin hidroliza substratului(ulei de floarea soarelui) de către enzima din 100 g de seminţe :

$$X = \frac{(V - v).F.100}{p} ,$$

undo : X - activitatea lipazei ;

V - ml soluţie de NaOH 0,1 N consumaţi la titrarea probei de cercetat ;

v - ml soluţie de NaOH 0,1 N consumaţi la titrarea martorului ;

F - factorul soluţiei de NaOH,stabilit cu ajutorul acidului oxalic ;

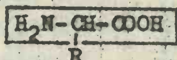
p - greutatea seminţelor analizate,g.

Bibliografie :1,11,15,20,32,37,42

10. AMINOACIZI SI PROTEINE SIMPLE

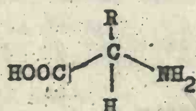
METABOLISMUL LOR

Aminoacizii(acizii aminici) sînt derivaţi ai acizilor carboxilici şi conţin în molecula lor atît gruparea aminică($-NH_2$) cît şi gruparea carboxil($-COOH$). In majoritatea aminoacizilor naturali gruparea aminică se găseşte fixată la carbonul α, deci ei au următoarea formulă generală :

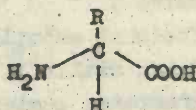


Radicalul R poate fi de natură alifatică, aromatică sau heterociclică.

Intrucît atomul de carbon α este asimetric, toţi α-aminoacizii întîlniţi în celula vie(cu excepţia glicocolului: R= -H) pot exista în două forme izomere(enantiomere), notate cu L(levo) şi D(dextro) :



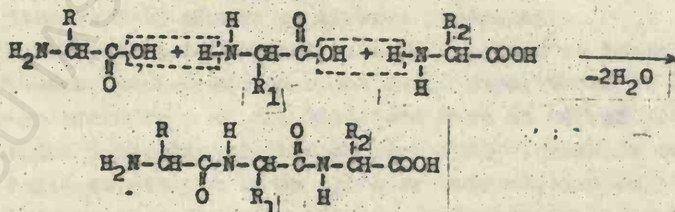
L-Aminoacid



D-Aminoacid

Aproape toţi aminoacizii din compoziţia materiei vii aparţin seriei L, aminoacizii din seria D întîlnindu-se numai în unele microorganisme şi în tumorile maligne.

Prin condensarea grupării carboxil a unui aminoacid cu gruparea aminică a altui aminoacid se formează un nou tip de legătură numită <u>legătură peptidică</u> :



Compușii care apar în urma formării legăturilor peptidice între resturile de aminoacizi se numesc peptide. După numărul resturilor de aminoacizi se deosebesc dipeptide, tripeptide etc. Peptidele conținînd de la doi la zece aminoacizi poartă denumirea de oligopeptide, iar peste această cifră, polipeptide. Ultimele, adică polipeptidele constituie părțile componente ale moleculelor de proteine. Macromoleculele diferitelor proteine pot fi alcătuite din unul sau cîteva lanțuri polipeptidice.

In compoziția proteinelor intră constant 20-22 de aminoacizi. Avînd în vedere că proteinele se compun din zeci și chiar sute de resturi de aminoacizi, rezultă că ei trebuie să se repete de mai multe ori în molecula proteică. Unitățile monomere identice se pot găsi alături sau pot să alterneze. In mod justificat, proteinele sînt considerate ca cele mai complexe substanțe dintre toți componenții biochimici ai celulei vii. Structura chimică a proteinelor explică marea diversitate și multiple funcții ale acestor biopolimeri, care îndeplinesc rol hotărîtor în toate procesele și fenomenele vieții.

Determinarea aminoacizilor și proteinelor în diferite obiecte biologice, precum și investigarea structurii și metabolismului acestor substanțe la nivel tisular și celular, prezintă mare importanță pentru soluționarea multor probleme capitale ale științelor biologice, medicale și agricole.

10.1. ANALIZA AMINOACIZILOR

Cum am arătat aminoacizii reprezintă unitățile structurale monomere ale moleculelor de proteine. In afară de aceasta, ei se găsesc totdeauna și în stare liberă în țesuturile animale sau vegetale. Conținutul aminoacizilor liberi în celulele organismului animal sau vegetal nu este constant și depinde de factorii externi, starea generală a organismului respectiv, precum și de direcția de desfășurare a proceselor metabolice caracteristice lui.

Astfel, în țesuturile vegetale se observă creșterea conținutului total de aminoacizi liberi și acumularea unor cantități anormal de ridicate de anumiți aminoacizi în cazul insuficienței potasiului, sulfului, calciului, magneziului, unor microelemente

(zinc,cupru,mangan,fier) în nutriţia plantelor.Spre deosebire de influenţa acestor elemente,insuficienţa azotului şi molibdenului conduce la scăderea cantităţii aminoacizilor şi amidelor în organele vegetative ale plantelor.

Unele specii de plante adesea acumulează aminoacizii caracteristici numai pentru specia dată,ceea ce determină particularitatea metabolismului lor.

In ţesuturile organismelor animale cantitatea aminoacizilor liberi,de asemenea,suferă fluctuaţii în funcţie de natura hranei şi starea fiziopatologică.

Determinarea aminoacizilor din compoziţia proteinelor sau aminoacizilor liberi din organele plantelor şi animalelor se practică pentru studierea mai detaliată a valorii nutritive a produselor alimentare şi furajelor,de asemenea,în cazul investigării diferitelor procese ale metabolismului azotat în organismele vii.Intre metodele larg utilizate în acest scop se numără cromatografia pe hîrtie.

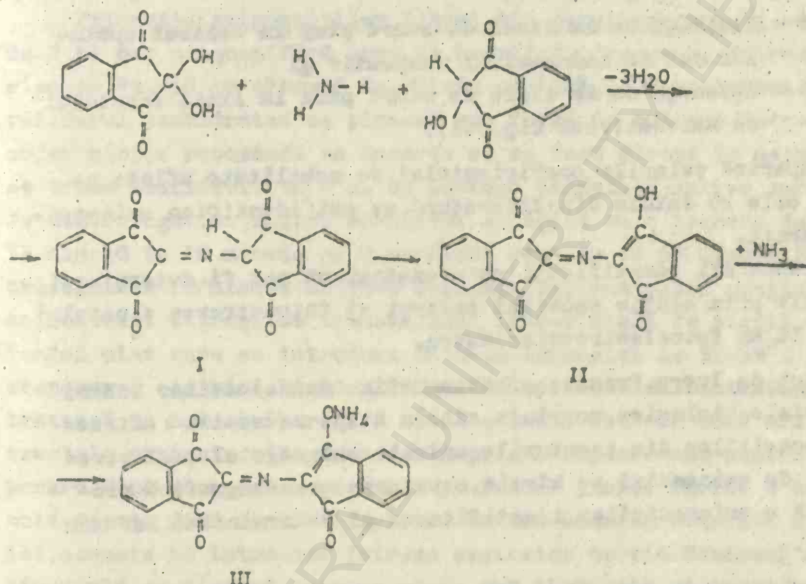
10.1.1.DETERMINAREA AMINOACIZILOR LIBERI PRIN METODA CROMATOGRAFIEI PE HIRTIE

Principiul metodei.Aminoacizii liberi se extrag din ţesuturile animalelor sau plantelor cu alcool etilic sau cu apă.Extractele obţinute se purifică şi se supun cromatografiei pe hîrtie.Datorită diferenţelor existente între constantele de distribuţie(repartiţie) ale diverşilor aminoacizi,aceştia pot fi separaţi,cu ajutorul unui sistem de solvenţi organici saturaţi cu apă,pe hîrtie de filtru introdusă într-o cameră cromatografică. Aminoacizii separaţi pe hîrtia cromatografică,sînt puşi în evidenţă prin reacţia de culoare cu reactivi specifici,cel mai adesea cu ninhidrină.Intre aminoacizi şi ninhidrină are loc următoarea reacţie :

$$C_6H_4(CO)_2C(OH)_2 + R{-}CH(NH_2){-}COOH \longrightarrow C_6H_4(CO)_2CH(OH) + R{-}CHO + NH_3 + CO_2$$

Ninhidrină   Dicetohidroxi-hidrinden

Amoniacul degajat se condensează cu o nouă moleculă de ninhidrină şi cu cetcalcoolul format prin reducerea ei,rezultînd combinaţia(I),care la pH=4,5 se transformă în enolul (II) a cărui sare de amoniu (III) este colorată în roşu-violet sau purpuriu-albastru :



După imersare sau pulverizare cu o soluţie de ninhidrină, cromatograma se usucă.Pe hîrtie apar zone(spoturi) colorate în diferite locuri care corespund diverşilor aminoacizi.

Cunoscînd condiţiile experienţei se pot determina după aceste spoturi colorate tipurile de aminoacizi existente în extractul tisular analizat.Identificarea aminoacizilor pe cromatogramă se face prin cîteva procedee.

Cel mai simplu,aşa-numitul procedeu al martorilor constă în aceea că pe aceeaşi fîşie de hîrtie se cromatografiază amestecul de cercetat şi o probă cu aminoacizi cunoscuţi.Soluţia martorilor şi cea de analizat se aplică pe hîrtie,în acelaşi timp,pe linia de start.Pe cromatogramă se compară vizual poziţia spoturilor colorate a aminoacizilor din soluţia de analizat cu poziţia aminoacizilor din proba martorilor.

O altă metodă de identificare se reduce la determinarea așa-numitului coeficient de mobilitate R_f al aminoacizilor, care practic se poate calcula folosind ecuația (5.3) :

$$R_f = \frac{d}{D},$$

unde : d - distanța de la linia de start pînă în centrul spotului dat de aminoacidul respectiv și

D - distanța de la linia de start pînă la linia frontului de solvent (vezi fig.5.1).

Comparînd valorile coeficientului de mobilitate aflate pe această cale cu datele din literatură se pot identifica aminoacizii separați.

Aminoacizii identificați pe cromatogramă pot fi determinați cantitativ prin eluția spotului colorat și fotometrarea eluatului obținut la un fotoelectrocolorimetru.

Modul de lucru. Practic cromatografia aminoacizilor liberi în obiectele biologice, cuprinde cîteva etape succesive : extracția aminoacizilor din țesuturile animale sau vegetale, aplicarea soluției de aminoacizi pe hîrtie, separarea cromatografică propriu-zisă a aminoacizilor, identificarea și determinarea lor cantitativă.

Extracția aminoacizilor liberi din țesuturile animale.

Se cîntăresc 2 g țesut prelevat imediat după moartea animalului și se triturează într-un mojar în prezență de nisip de cuarț sau sticlă pisată pînă la obținerea unei paste perfect omogene. Peste pasta astfel obținută se adaugă 10 ml acetonă acidulată (100 ml acetonă + 1 ml HCl concentrat). După 30 minute se centrifughează timp de 10 minute la 3000rot./min. Supernatantul separat se transvazează într-un pahar Berzelius de 25 ml care se introduce într-un termostat la 37-38°C pentru evaporarea acetonei. Operația de extracție a reziduului din eprubeta de centrifugă cu 10 ml de acetonă se repetă încă de două ori, de fiecare dată supernatantul turnîndu-se în paharul Berzelius, după care se evaporă la sec în termostat sau pe baia de apă. Reziduul din pahar se reia cu 1ml soluție de HCl 1N și se filtrează pe o hîrtie de filtru cantitativă. Se spală paharul și filtrul cu 1 ml soluție de HCl 1N.

Filtratul se evaporă la sec.Se reia reziduul cu 5 ml soluţie de NH_4OH 0,5 N şi apoi se filtrează .La filtrat se adaugă 10 ml eter etilic.Se agită,se separă stratul eteric,iar stratul apos se evaporă din nou pe baie de apă la sec.Reziduul se reia cu 1 ml soluţie de NH_4OH 0,5 N .

Extracţia aminoacizilor liberi din serul sanguin.Un volum de 2 ml ser sanguin(fără urme de hemoliză) se usucă într-un exsicator de vid cu clorură de calciu anhidră,la temperatura camerei.Serul deshidratat se pisează sub formă de pulbere într-un mojar mic(se recomandă ca uscarea să se facă direct în mojar) şi se trece cantitativ cu 8 ml de acetonă acidulată într-o eprubetă de centrifugă.Conţinutul eprubetei se agită cu o baghetă de sticlă din 10 în 10 minute pe o perioadă de timp de 60 minute.Se centrifughează 10 minute la 3000 rot./min.Supernatantul conţinînd aminoacizii extraşi se transvazează într-o fiolă de sticlă cu fundul plat care se introduce într-un termostat la 37-38°C pentru evaporarea acetonei.Reziduul rămas în eprubeta de centrifugă se tratează în mod similar cu 8 ml de acetonă încă de două ori,extractele obţinute adăugîndu-se la primul supernatant pentru evaporare.După evaporarea acetonei pe fundul fiolei rămîne o peliculă foarte fină de lichid uleios.Pentru uscarea completă a fiolei,aceasta se introduce într-un exsicator de vid.Reziduul uscat din fiolă se dizolvă într-un ml de apă distilată şi se eliberează de lipide prin adăugarea a 2 ml eter etilic.Majoritatea eterului se poate absorbi cu o pipetă,iar stratul fin rămas se îndepărtează cu ajutorul unei fîşii înguste de hîrtie de filtru.Soluţia apoasă de aminoacizi din nou se evaporă într-un exsicator de vid timp de 18-24 ore,după care reziduul uscat se reia cu 0,1 ml apă distilată.Din soluţia obţinută se aplică pe hîrtia cromatografică probe de cîte 0,02 ml(ceea ce corespunde la 0,4 ml ser nativ) pentru separarea aminoacizilor prin cromatografia unidimensională şi probe de cîte 0,06 ml(corespunzător la 1,2 ml ser) pentru cromatografia bidimensională.

Extracţia aminoacizilor liberi din plantele de cultură.Se recoltează aproximativ 5-10 g seminţe mature sau imature ,frunze proaspete sau alte organe vegetative şi se spală cu apă de la robinet,apoi cu apă distilată pentru îndepărtarea impurităţilor

aderente.Se pune pe o hîrtie de filtru sau pe un vas de sticlă şi se usucă în etuvă la 90°C,timp de 48 ore fără întrerupere.Probele uscate se macină pînă la obţinerea unei pulberi fine.Din pulberea obţinută se cîntăresc între 2 şi 5 g,în funcţie de natura produsului de analizat şi se extrag cu 10 ml alcool etilic 96%(încălzit la 50-60°C pe baie de apă) timp de 2 ore,prin agitare permanentă.Extractul se separă prin centrifugare şi se transvazează într-o pîlnie de separare.Reziduul se extrage încă de două ori cu cîte 10 ml de alcool 80%.Ultimele două supernatante se unesc cu primul în pîlnia de separare şi la lichidul obţinut se adaugă 15 ml cloroform şi 15 ml apă distilată.Amestecul se agită cu atenţie şi se lasă în repaus 10 minute.Stratul superior conţinînd aminoacizii extraşi se separă şi se evaporă la sec pe baie de apă.Reziduul se dizolvă într-un ml soluţie de alcool izopropilic 10% în soluţie de HCl 0,1 N.

<u>Aplicarea soluţiei de aminoacizi pe hîrţia cromatografică</u>. La aplicarea soluţiei de aminoacizi pe hîrtia cromatografică se cer respectate o serie de reguli.După metodica clasică diametrul punctului de start unde se aplică proba nu trebuie să depăşească 5-6 mm.Pentru a realiza acest lucru,aplicarea probelor se face în mod repetat cu ajutorul unei micropipete gradate în porţiuni de cîte 0,003-0,005 ml în cromatografia unidimensională(monodimensională) şi cu o cantitate de cîte 0,010-0,015 ml în cromatografia bidimensională.Fiecare nouă porţiune de soluţie se aplică după uscarea completă a celei precedente.

Pentru o orientare mai bună pe linia de start a cromatogramei se desenează anticipat cu creionul un cerc cu diametrul cerut(5-6 mm),unde se aplică soluţia de analizat.Punctul de start se alege la 5,5 cm de la capătul hîrtiei cromatografice,iar în tehnica bidimensională într-un colţ,la distanţa de 6-7 cm faţă de lungimea şi lăţimea hîrtiei,în funcţie de adîncimea vasului cu faza mobilă în care se introduce capătul hîrtiei.

La aplicarea soluţiilor de aminoacizi trebuie să se ţină cont de capacitatea hîrtiei,mai ales în cazul cromatografiei monodimensionale pe fîşii înguste."Incărcarea" hîrtiei conduce la spălarea aminoacizilor dizolvaţi,cauzată de lipsa

echilibrului între aceştia şi solvent şi adsorbţia lor în procesul de separare cromatografică.

In cazul identificării aminoacizilor cu ajutorul martorilor, atunci se folosesc două soluţii standard de aminoacizi cu compoziţia indicată în tabelul 10.1, care se aplică odată cu probele de cercetat pe aceeaşi hîrtie cromatografică.

Tabelul 10.1

Compoziţia soluţiilor standard de aminoacizi

Soluţia A	Concentraţia, mg/10 ml	Soluţia B	Concentraţia, mg/10 ml
Cisteină	70	Lizină	59
Histidină	62	Arginină	69
Acid aspartic	53	Serină	42
Glicocol	30	Acid glutamic	59
Treonină	47	Alanină	35
Prolină	46	Metionină	59
Tirozină	72	Leucină	54
Valină	46		
Fenilalanină	55		

Ambele amestecuri se aduc la 10 ml cu acelaşi solvent întrebuinţat la dizolvarea reziduului obţinut după ultima evaporare a soluţiei de aminoacizi extraşi din materialul cercetat.

Distribţia relativă a diferiţilor aminoacizi prin cromatografierea soluţiilor standard menţionate este arătată în cromatograma din fig.10.1. In spotul notat cu N se găseşte roşu neutral. Acest indicator are un coeficient de mobilitate R_f de acelaşi ordin de mărime cu cel al leucinei şi de acea cu ajutorul lui se poate urmări cînd aminoacidul care migrează cel mai repede ajunge la marginea de jos a cromatogramei în procedeul descendent.

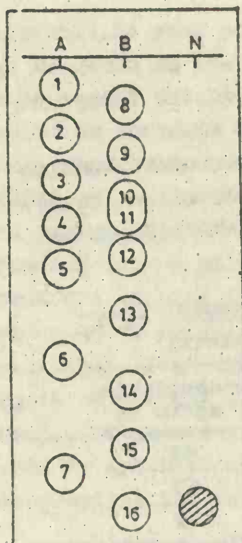


Fig.10.1.Dispunerea aminoacizilor pe hîrtie în cromatografia descendentă în sistemul butanolic.
A şi B-amestecuri de aminoacizi,N-roşu neutral.
1-Cisteina;2-Histidina;3-Acid aspartic;
4-Glicocol;5-Treonina;6-Prolina;
7-Fenilalanina;8-Lizina;9-Arginină;
10-Metionina;11-Serina;12-Acid glutamic;
13-Alanina;14-Tirozina;15-Valina;
16-Leucina.

<u>Separarea</u> <u>cromatografică</u> <u>a</u> <u>aminoacizilor</u>.Pentru cromatografia aminoacizilor se foloseşte de obicei hîrtia Schleicher-Schüll 2043 b şi Whatman 1.Dimensiunile hîrtiei pot varia în funcţie de parametrii camerei cromatografice :Distanţa între punctele de start trebuie să fie de 2-3 cm în cazul cînd pe aceeaşi foaie de hîrtie se aplică mai multe probe.Locul startului pe hîrtie depinde de metoda cromatografică folosită(vezi pag.186).

Pentru o separare mai bună a aminoacizilor prin cromatografia monodimensională,se pot folosi forme modoficate ale fîşiilor de hîrtie,aşa cum se arată în figura 10.2.

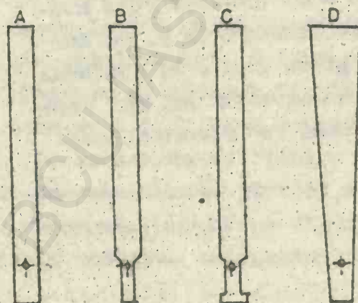


Fig.10.2.Fîşii de hîrtie pentru cromatografia monodimensională.
A-Formă obişnuită;B,C-Forme cu istm;D-Formă cu aspect conic.
Cercul-locul de aplicare a soluţiilor de aminoacizi.

Pe cromatogramele B,C şi D spre deosebire de cromatograma obişnuită spoturile de aminoacizi se separă şi se evidenţiază mult mai izolat,ceea ce este important pentru analiza cantitativă.

După aplicarea soluţiilor de aminoacizi hîrtia se introduce în vasul cu faza mobilă şi se lasă să migreze dizolvantul prin hîrtie.Se închide apoi ermetic camera cromatografică.Pentru a reduce la minim evaporarea dizolvantului de pe suprafaţa hîrtiei asigurîndu-se astfel stabilitatea compoziţiei sistemului,se saturează atmosfera cu vapori de dizolvant care se toarnă direct în vase aşezate pe fundul camerei cromatografice.

In literatură sînt descrise multe sisteme de dizolvanţi utilizate pentru analiza cromatografică a aminoacizilor.Unul din aceste sisteme care se poate întrebuinţa în multe cazuri este alcătuit din n-butanol-apă-acid acetic(120:50:30).Sistemul de dizolvanţi proaspăt preparat se poate utiliza imediat;nu se recomandă să fie păstrat mai mult de 10-15 zile,întrucît după acest interval de timp se produce esterificarea.

O separare foarte bună a aminoacizilor se realizează prin irigarea hîrtiei de 4-5 ori cu dizolvant.Faza mobilă se lasă să curgă de 3 ori pînă la 2/3 din lungimea hîrtiei,apoi de 2 ori pînă la capătul fîşiei.După fiecare migrare a dizolvantului cromatograma se usucă într-un curent de aer.

In cazul necesităţii de separare rapidă a aminoacizilor se poate lucra după tehnica circulară sau radială.

Cromatografia circulară.Cromatografia circulară se bazează pe migrarea substanţelor amestecului de cercetat,din mijlocul hîrtiei în toate direcţiile.In cromatografia circulară hîrtia sub forma unei rondele se aşază orizontal,iar probele de studiat se aplică circular la o mică distanţă de punctul central.Faza mobilă se aduce din vas cu ajutorul unui fitil de hîrtie de filtru.Aparatura folosită în această tehnică constă din două vase rotunde care pot avea dimensiuni variabile,funcţie de scopul urmărit.Pentru încercări preliminarii se folosesc două cutii Petri cu acelaşi diametru(8-12 cm).Pentru separarea amestecurilor complexe de aminoacizi se recomandă folosirea exsicatoarelor.Rondela de hîrtie se aşază între capac şi partea inferioară a exsicatorului,

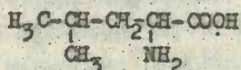
iar dizolvantul se aduce cu ajutorul unui fitil.

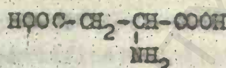
Reactivi.1.Soluţie de acid aspartic M/100 în alcool izopropilic 10%.

2.Soluţie de tirozină M/100 în alcool izopropilic 10%.

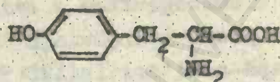
3.Soluţie de leucină M/100 în alcool izopropilic 10%.

4.Amestec de soluţie M/100 de acid aspartic,tirozină şi leucină în alcool izopropilic 10%.





Leucina (Acid α-aminoizocaproic) Acid aspartic (Acid α-aminosuccinic)



Tirozina

[Acid α-amino-β-(para-hidroxi-fenil)-propionic]

5.Sistemul de dizolvanţi.Se amestecă 60 ml alcool butilic normal(n-butanol) cu 25 ml apă distilată şi 15 ml acid acetic glacial într-o pîlnie de separare.După amestecare sistemul de dizolvanţi se scurge în cutia Petri.

6.Soluţie de ninhidrină 0,5%.Se dizolvă 0,5 g ninhidrină recristalizată în 95 ml acetonă şi se adaugă 4 ml apă distilată şi 1 ml acid acetic concentrat.

Tehnica cromatografierii.Pe un disc de hîrtie cromatografică,se aşază cu ajutorul pensetei un şablon transparent cu cinci orificii(unul central şi patru radiale).După ce se notează cu creionul aceste semne pe hîrtia cromatografică,şablonul se îndepărtează.Discul de hîrtie marcată se pune într-o hîrtie de filtru obişnuită,împăturită în două aşa ca semnul central să nu fie acoperit.Strîngînd hîrtia aproape de acest semn între degetul mare şi cel arătător se sparge semnul central cu un instrument ascuţit, de exemplu cu o baghetă de sticlă avînd diametrul de 0,5 cm şi unul din capete ascuţit.Din hîrtia cromatografică lată de 1,2 cm şi lungă de 1,5-2,0 cm se face un fitil,înfăşurînd foaia de hîrtie pe o baghetă de sticlă cu diametrul ceva mai mic decît cel

al orificiului central.Fitilul se montează pînă la 3/4 din lungimea lui în orificiu,continuînd să ţinem rondela de hîrtie cromatografică în foaia de hîrtie împăturită în două.

După aceea pe unul din cele patru semne radiale se aplică cu o micropipetă o picătură(0,003 ml) din soluţia amestecului de aminoacizi,iar pe celelalte trei semne picături separate din fiecare soluţie de aminoacid.Se notează pe marginea rondelei de hîrtie aminoacidul,a cărui soluţie s-a pipetat pe locul indicat prin semnul respectiv.Hîrtia cromatografică se usucă în aer(aer cald).Apoi,rondela de hîrtie se aşază cu capătul lung al fitilului în jos pe cutia Petri,conţinînd dizolvantul pentru eluare şi se acoperă cu cealaltă cutie Petri.Solventul se ridică prin fitil şi se răspîndeşte radial în hîrtia cromatografică.Viteza de cromatografiere depinde de grosimea fitilului şi de distanţa între suprafaţa solventului şi suprafaţa hîrtiei,precum şi de calitatea hîrtiei cromatografice.

Peste 60 minute,cînd solventul pe rondela de hîrtie va avea diametrul de 6-7 cm,hîrtia cromatografică se ia cu ajutorul unei pensete,se marchează cu un creion frontul solventului şi se usucă în aer timp de 1-2 ore pînă la îndepărtarea completă a solventului.Cromatograma uscată se developează(prin imersare sau mai bine prin pulverizare) cu soluţie de ninhidrină 0,5%.Apoi cromatograma se usucă în aer timp de 30-60 minute,după care se introduce în termostat la 80^{o} pentru 5-10 minute,temperatura favorizînd dezvoltarea culorii produsului de reacţie dintre aminoacizi şi ninhidrina.

După developare şi uscare pe cromatogramă vor apare,în cazul amestecului de aminoacizi,trei arcuri de cerc colorate în roşu-violet,care indică separarea acidului aspartic,tirozinei şi leucinei.In cazul soluţiilor separate de aminoacizi vor apare cîte un arc de cerc colorat,corespunzător aminoacidului respectiv.Zona corespunzătoare acidului aspartic se află aproape de centru,zona tirozinei ocupă o poziţie intermediară,iar zona leucinei se găseşte aproape de marginea cromatogramei(fig.10.3).

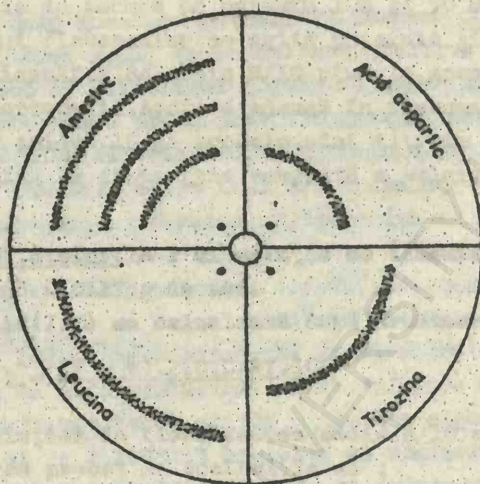


Fig.10.3. Cromatografia circulară a amestecului de acid aspartic, tirozină şi leucină şi a fiecăruia din aceşti aminoacizi.

<u>Identificarea</u> <u>şi</u> <u>determinarea</u> <u>cantitativă</u> <u>a</u> <u>aminoacizilor</u>. Identificarea aminoacizilor din amestec pe cromatogramă se efectuează cu ajutorul spoturilor aminoacizilor cromatografiaţi separat şi care s-au folosit drept martori.

Spoturile aminoacizilor din amestec se stabilesc prin coeficientul de mobilitate R_f. Pentru calcularea lui R_f se determină distanţa (în mm) de la punctul de start pînă în centrul spotului aminoacidului şi se împarte la distanţa parcursă de la start de frontul solventului (vezi p.184).

Determinarea cantitativă a aminoacizilor separaţi pe cromatogramă se poate realiza prin diferite procedee. Unul din aceste procedee se bazează pe formarea complecşilor aminoacizilor cu cupru şi ninhidrină.

Cromatograma developată cu ninhidrină este trecută printr-o soluţie de azotat de cupru (1 ml soluţie saturată de $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ se amestecă cu 0,02 ml acid azotic concentrat şi se completează la

100 ml cu acetonă sau alcool etilic 96%).După uscare timp de 30 minute la aer spoturile de pe cromatogramă îşi schimbă culoarea din violet în roşu-oranj.Spoturile colorate se decupează,se taie mărunt şi se introduc în eprubete curate şi uscate.In fiecare eprubetă se adaugă cîte 5 ml metanol şi se agită.Complexul colorat,se eluează complet în timp de 15-30 minute,se colorimetrează faţă de o probă de control(care reprezintă eluatul unui fragment necolorat de cromatogramă,egal ca mărime cu un spot de aminoacid de dimensiuni medii) la 530 nm(filtru verde).

Calculul rezultatelor.Pentru calcularea rezultatelor este necesar să se traseze cîte o curbă de etalonare pentru fiecare aminoacid.Curbele de etalonare,se construiesc folosind soluţii standard din fiecare aminoacid conţinînd cantităţi crescătoare de la 0,07 la 2,8 micrograme de azot α-aminic.Soluţiile standard se cromatografiază în mod identic şi pe baza extincţiilor obţinute pentru fiecare aminoacid se trasează curbe de etalonare corespunzătoare,trecînd pe ordonată extincţia şi pe abscisă micrograme azot aminic în probă.Pe aceste curbe etalon se află concentraţia diferiţilor aminoacizi în soluţia cercetată.

Conţinutul aminoacizilor se exprimă în mg la 100 g de ţesut proaspăt sau 100 ml lichid biologic.

10.1.2.DETERMINAREA AZOTULUI AMINIC

Azotul aminic liber constituie azotul aminoacizilor liberi conţinuţi în materialul de cercetat.Determinarea azotului aminic este necesară în cazul analizei formelor de combinaţii azotate, îndeosebi în investigarea metabolismului aminoacizilor şi proteinelor

10.1.2.1.DOZAREA AZOTULUI AMINIC LIBER IN SERUL SANGUIN(METODA G.A.UZBEKOV,MODIFICATA DE Z.S.CIULKOVA)

Principiul metodei.Conţinutul de azot aminic se determină colorimetric după reacţia de culoare a aminoacizilor cu ninhidrina.

Reactivi.1.Soluţie de acid acetic 0,04 N(Se diluează 0,23 ml acid acetic glacial cu 100 ml apă distilată).

2.Soluţie apoasă de ninhidrină 1%.

Modul de lucru.Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml ser sanguin şi 0,5 ml soluţie de acid acetic 0,04 N.Se agită, se închide cu un dop şi se introduce într-o baie de apă rece care se aduce la fierbere.După 5 minute de la fierberea apei în baie,eprubeta se scoate şi se răceşte.

In eprubetă se pipetează 1 ml de apă distilată,se agită conţinutul ei cu o baghetă de sticlă şi se filtrează pe filtru cantitativ într-o eprubetă gradată de 10 ml.Eprubeta de centrifugă şi precipitatul de pe filtru se spală încă de trei ori cu cîte 1 ml apă distilată.

La filtratul obţinut se adaugă 0,5 ml soluţie de ninhidrină 1%,conţinutul probei se agită prin scuturarea eprubetei şi se introduce timp de 20 minute într-o baie de apă la fierbere.Apoi eprubeta se răceşte într-un curent de apă de robinet,se lasă în repaus 5 minute la temperatura camerei şi se completează cu apă distilată pînă la 10 ml(după semnul de pe eprubetă).

In paralel se execută controlul pentru reactivi.La 3 ml apă distilată se adaugă 0,5 ml soluţie de acid acetic 0,04 N şi 0,5 ml soluţie de ninhidrină 1%,se agită şi se încălzeşte timp de 20 minute pe baie de apă în fierbere.Se răceşte eprubeta şi se completează volumul la 10 ml cr apă distilată.

Extincţia probei cu ser se măsoară la un fotoelectrocolorimetru,utilizînd lungimea de undă de 536 nm(filtru verde) şi cuva de 5 mm,faţă de controlul reactivilor sau apă distilată.

Calculul rezultatelor.Prin raportare la curba etalon,construită cu concentraţii crescînde de alanină(6-30 micrograme azot aminic în probă),se află numărul microgramelor de azot corespunzător extincţiei probei de cercetat.Pentru calcularea rezultatelor în mg% se foloseşte următoarea formulă :

$$\text{mg N\%} = \frac{a.100}{0,5.1000} ,$$

unde:a - micrograme N aminic corespunzătoare extincţiei probei cu ser.

Importanța practică. Conținutul azotului aminic în serul oamenilor sănătoși oscilează între limitele de 2-4,3 mg%, avînd o valoare medie de 2,9 mg%.

Creșterea nivelului aminoacizilor în sînge se observă după ingerarea unei hrane bogate în proteine, în coma hepatică, hepatita epidemică, intoxicații cu fosfor, fenilhidrazină, CCl_4, cloroform, în arsurile grave, diabetul zaharat cu cetoză; o creștere moderată poate să aibă loc în infecțiile acute, hipertiroidism, în unele cazuri de anemie, după administrarea ACTH etc.

Micșorarea cantității de aminoacizi se constată în nefroze, după administrarea glucozei, insulinei, hormonului de creștere, androgenilor.

10.1.2.2. DOZAREA AZOTULUI AMINIC IN PLANTE

Principiul metodei. Ninhidrina reacționează cu aminoacizii în mediu slab acid (pH 4,5) și în prezența acidului ascorbic, dînd un produs colorat care se determină colorimetric.

Reactivi. 1. Soluție tampon acetat 4 N cu pH 4,54. Se dizolvă 54,4 g $CH_3COONa.3H_2O$ în 100 ml apă distilată într-un pahar Berzelius. Soluția obținută se încălzește la fierbere pe sită de azbest și se fierbe pînă se evaporă aproximativ jumătate din volumul inițial. Soluția se răcește, se transvazează într-un balon cotat de 100 ml, se adaugă 30 ml acid acetic glacial și apă distilată pînă la semn.

2. Reactivul ninhidrinic. Se dizolvă 1,2 g ninhidrină recristalizată în 15 ml alcool n-propilic. Soluția obținută se amestecă cu 30 ml alcool n-butilic, 60 ml etilenglicol și 9 ml soluție tampon acetat 4 N cu pH 4,54.

3. Soluție stoc de leucină (α-alanină). Se dizolvă 46,8 mg leucină (sau 31,8 mg α-alanină) în 100 ml soluție de alcool izopropilic 10%, la balon cotat. Această soluție stoc conține 50 micrograme azot aminic într-un ml. Pentru prepararea soluției etalon se diluează 5 ml soluție stoc într-un balon cotat la 50 ml cu apă distilată. Intr-un ml soluție de lucru se găsesc 5 micrograme azot aminic.

4. Soluție de acid ascorbic 1%. Această soluție se prepară în momentul întrebuințării, dizolvînd 0,1 g acid ascorbic în 10 ml

apă distilată.

Modul de lucru. O cantitate de 0,5 g material vegetal proaspăt,conţinînd 50-500 micrograme azot aminic,se mojarează cu 5 ml soluţie de acid acetic 10%.Amestecul obţinut se aduce cantitativ într-un balon cotat de 100 ml şi se completează la semn cu apă distilată.Conţinutul balonului se agită şi se filtrează printr-un filtru uscat,aruncînd primii ml de filtrat.Din filtratul rămas se pipetează 2 ml într-o eprubetă gradată de 10 ml,se adaugă apoi 3 ml reactiv ninhidrinic şi 0,1 ml soluţie de acid ascorbic 1%.Se agită conţinutul,se închide eprubeta cu o pîlnie sau cu o pară de sticlă şi se introduce pentru 15 minute în baie la fierbere.

In paralel se fierbe şi proba de control pentru reactivi care cuprinde 2 ml apă distilată,3 ml reactiv ninhidrinic şi 0,1ml soluţie de acid ascorbic.

După fierbere pe baie de apă,eprubetele se răcesc în aer timp de 15 minute,agitînd probele din 3 în 3 minute.După răcire, volumul probelor se completează cu alcool etilic 60% la 5 ml şi se agită conţinutul lor.

Extincţia probei de cercetat se măsoară la 580 nm,faţă de proba de control.

Calculul rezultatelor.Pe curba etalon se găseşte cantitatea de azot aminic corespunzătoare extincţiei probei de cercetat.Conţinutul azotului aminic în materialul vegetal cercetat se calculează după formula :

$$\text{mg azot aminic \%} = \frac{a.100.100}{2.p.1000} ,$$

unde: a - cantitatea de azot aminic în proba de cercetat(în micrograme) ;

p - greutatea ţesutului vegetal luată în analiză(în grame).

Construirea curbei etalon.In eprubete gradate de 10 ml se măsoară următoarele cantităţi de soluţie etalon de leucină(α-alanină),conţinînd 5 micrograme azot într-un ml : 0,2;0,4;0,6;0,8;1,2; 1,6;1,8 şi 2 ml ,se completează volumul cu apă distilată la 2 ml. Intr-o altă eprubetă(control) se iau numai 2 ml apă distilată. In toate eprubetele se adaugă cîte 3 ml reactiv ninhidrinic şi

cîte 0,1 ml soluţie de acid ascorbic 1%.După ce se agită conţinutul lor,eprubetele se închid cu pîlnii sau dopuri sferice de sticlă şi se introduc într-o baie de apă la fierbere,unde se menţin timp de 15 minute din momentul în care apa începe să fiarbă. La sfîrşitul intervalului de fierbere,eprubetele se scot din baie se răcesc la temperatura camerei timp de 15 minute,cu agitare periodică.Se completează volumul probelor la 5 ml cu alcool etilic 60% şi se măsoară extincţiile la 580 nm,comparativ cu controlul.Pe baza datelor obţinute se trasează curba etalon.

10.1.3.DETERMINAREA TRIPTOFANULUI

Triptofanul(acidul α-amino-β-indolpropionic) este un aminoacid esenţial(neînlocuibil) pentru animale şi om.Catabolismul triptofanului în organismele vii are loc pe mai multe căi conducînd la diferiţi produşi finali(acid nicotinic,5-hidroxi-triptamină,acid indolacetic etc) dintre care unii îndeplinesc un rol biologic deosebit în ţesuturile animale şi vegetale.

Triptofanul este larg răspîndit în proteinele de origine animală,se găseşte în cantitate foarte mică sau lipseşte complet în proteinele vegetale.In organele tinere ale plantelor există şi în stare liberă.

Determinarea conţinutului de triptofan are mare importanţă în ameliorarea plantelor,în cunoaşterea particularităţilor metabolismului acestui aminoacid în organismele animale şi vegetale.

Determinarea triptofanului în seminţele plantelor(Metoda A.I.Ermakov şi N.P.Jarosh)

Principiul metodei. Metoda de dozare a triptofanului se bazează pe obţinerea unei reacţii de culoare a acestui aminoacid cu p-dimetilaminobenzaldehida.In mediul puternic acid şi în prezenţa azotaţilor se formează o culoare albastră a cărei intensitate se măsoară la un fotoelectrocolorimetru.Prin această metodă triptofanul poate fi determinat în seminţele bogate în amidon,proteine,uleiuri fără izolarea proteinei.

Reactivi.1.Soluţie de para-dimetilaminobenzaldehidă 2,5 % în soluţie de HCl 10%.Soluţia păstrată în frigider este stabilă

timp de două săptămîni.

2.Soluţie de azotat de sodiu 1%.

3.Soluţie de gelatină 4% în soluţie de KOH 25%.

4.Soluţie de acid clorhidric concentrat.

Modul de lucru.Intr-un flacon conic de 100 ml se introduc 200 mg făină proaspăt obţinută din seminţe de cereale sau 100mg făină din seminţe de oleaginoase.La analiza seminţelor cu înveliş colorat acesta se îndepărtează,întrucît culoarea suplimentară impietează asupra determinării.In locul culorii albastre în mediul de reacţie uneori apare o culoare verde din cauza existenţei în seminţe a pigmenţilor galbeni,care se pot îndepărta spălînd făina cu n-butanol - sau eter de petrol.

Făina din flacon se umectează uniform cu 2 ml apă distilată.Apoi se adaugă 1 ml soluţie de gelatină 4% în soluţie de KOH 25%.In cazul formării de bulgări,amestecul se agită cu o baghetă de sticlă(capătul baghetei introdus în amestecul de reacţie se sterge cu bucăţi mici de hîrtie de filtru care se lasă în flacon). Flaconul se închide cu un dop de plută şi se termostatează pentru hidroliză la 40^{o}C,timp de 18-20 ore(peste noapte).

După hidroliză în flacon se adaugă 0,5 ml soluţie de p-dimetilaminobenzaldehidă 2,5% în HCl 10%,0,5 ml soluţie de $NaNO_3$ 1% şi 28 ml de HCl concentrat(densitate 1,19).Conţinutul se agită prin rotirea flaconului,se închide cu un dop şi se introduce în termostat la 25^{o}C,timp de 1,5 ore în cazul seminţelor amidonoproteice şi 3 ore pentru seminţele oleaginoaso-proteice.După această ultimă termostatare,amestecul de reacţie se completează la 100 ml adăugîndu-se 68 ml apă distilată sau la 50 ml prin adăugarea a 18 ml apă distilată,dacă conţinutul de triptofan este mic în obiectul cercetat.In mediul de reacţie diluat dezvoltarea culorii se întrerupe.

Soluţia se filtrează prin filtru de hîrtie cantitativă cu porozitate medie.Primii ml de filtrat se aruncă.Filtratul limpede se foloseşte pentru măsurarea extincţiei probei de cercetat la un electrofotocolorimetru,în filtru roşu.

Pentru determinarea concentraţiei triptofanului în probă este comod să se traseze curba de etalonare.

<u>Construirea curbei de etalonare</u>. Intr-un balon gradat de 25ml se dizolvă 25 mg triptofan în 20 ml apă distilată la care s-a adăugat 1 ml soluţie de KOH sau NaOH 0,1 N. Se completează la semn cu alcool etilic 96°. Intr-o serie de flacoane conice de 100 ml se pipetează cîte 2 ml apă distilată, 1 ml soluţie de gelatină în soluţie de KOH şi următorii reactivi în succesiunea : 0,5 ml soluţie de para-dimetilaminobenzaldehidă 2,5%; 0,5 ml soluţie de azotat de sodiu 1% ; 28 ml soluţie de HCl concentrat. Apoi se adaugă soluţie de triptofan cîte 0,1;0,2;0,3;0,4;0,5 ml în care se găsesc corespunzător 0,1;0,2;0,3;0,4;0,5 mg triptofan. Pentru dezvoltarea culorii albastre flacoanele se termostatează la 25°C timp de 60 minute. După aceasta volumul probelor se completează cu apă distilată la 100 ml (folosind biureta), soluţia se filtrează şi se măsoară extincţia la un fotoelectrocolorimetru, în filtru roşu. Pentru trasarea curbei etalon se trece pe abscisă cantitatea de triptofan (în mg într-un ml), iar pe ordonată extincţia soluţiilor.

<u>Calculul rezultatelor</u>. Pe curba de etalonare se află concentraţia de triptofan (în mg într-un ml) corespunzătoare extincţiei probei de cercetat. Conţinutul procentual de triptofan (mg%) se calculează cu formula următoare :

$$mg\ \% = \frac{a.100.100}{p} ,$$

unde : a - cantitatea de triptofan (în mg într-un ml) corespunzătoare extincţiei probei ;

p - greutatea făinii (în g) luată pentru analiză.

Cunoscînd umiditatea făinii, conţinutul de triptofan se recalculează la 100 g substanţă uscată.

Conţinutul de triptofan se poate, de asemenea, exprima în procente de azot faţă de azotul total al seminţelor cercetate sau în procente faţă de proteina brută.

10.2. ANALIZA PROTEINELOR

Proteinele constituie cei mai importanţi componenţi ai materiei vii. Ele joacă un rol esenţial în toate procesele şi fenomenele vieţii, îndeplinind o diversitate de funcţii. Prima şi cea mai însemnată funcţie a proteinelor este funcţia catalitică sau enzimatică. Protein-enzimele catalizează în celula vie toate reacţiile chimice de scindare a unor compuşi şi de sinteză a altora. In organismul viu proteinele pot avea funcţie structurală, determină proprietăţile receptorilor specifici din membrane, intră în compoziţia sistemelor contractile, îndeplinesc funcţii reglatoare, transportoare şi de apărare.

Din punct de vedere structural proteinele se clasifică în două grupe mari : proteine simple şi proteine complexe sau conjugate sau heteroproteine. Proteinele simple sînt alcătuite numai din resturi de aminoacizi. Proteinele complexe conţin pe lîngă aminoacizi alte substanţe de natură neproteică (glucide, lipide, acizi nucleici etc.) care se numesc grupări prostetice.

Studiul structurii şi funcţiilor proteinelor simple şi complexe reprezintă una din direcţiile principale ale biochimiei contemporane.

Determinarea proteinelor totale şi studiul fracţiunilor proteice în serul sanguin şi ţesuturile animale prezintă o mare valoare pentru stabilirea diagnosticului diferitelor stări patologice şi urmărirea influenţei unor factori ecologici asupra metabolismului proteic în organismul animal.

Cunoaşterea conţinutului de proteine totale şi a fracţiunilor proteice principale în seminţele şi organele vegetative ale diverselor culturi este absolut necesară în procesul de ameliorare a plantelor.

10.2.1. DETERMINAREA AZOTULUI

10.2.1.1. DETERMINAREA AZOTULUI TOTAL

Azotul intră în compoziţia multor substanţe chimice întîlnite în organismele animale şi vegetale-proteine, peptide, aminoacizi, acizi nucleici etc (N-proteic, N-peptidic, N-aminic, N-nucleic etc.).

Toate formele de azot existente într-un preparat biologic sînt cuprinse sub denumirea de azot total.

Pentru determinarea azotului total foarte frecvent se utilizează micrometoda Kjeldahl.

Principiul metodei. Substanţele organice conţinute în materialele biologice, prin fierbere cu acid sulfuric concentrat în prezenţă de catalizatori, se descompun, eliberînd elementele lor constitutive sub diferite forme : carbonul ca dioxid de carbon, hidrogenul şi oxigenul ca apă, fosforul ca acid fosforic sau fosfor mineral, iar azotul este transformat cantitativ în amoniac. Amoniacul astfel apărut reacţionează cu acidul sulfuric aflat în exces formînd sulfat de amoniu :



$$2NH_3 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

Sulfatul de amoniu rezultat, în mediu puternic alcalin se scindează cu eliberarea amoniacului, conform ecuaţiei :



$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O$$

Amoniacul eliberat este distilat prin antrenare cu vapori de apă şi captat într-un volum cunoscut de soluţie titrată de acid sulfuric, legîndu-se sub formă de sulfat de amoniu. Excesul de acid sulfuric este titrat cu o soluţie de aceeaşi normalitate de NaOH:



$$H_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + 2H_2O$$

După cantitatea de acid sulfuric care a reacţionat cu amoniacul se calculează conţinutul procentual de azot total.

Reactivi. 1. Acid sulfuric concentrat (d=1,84).

2. Sulfat de cupru cristalizat p.a.

3. Sulfat de potasiu c.p.

4. Soluţie de NaOH 33%. Soluţia se fierbe pentru îndepărtarea combinaţiilor organice azotate, care ar putea să existe în reactiv. Se păstrează într-o sticlă cu dop de cauciuc.

5. Soluţie de acid sulfuric N/50. Se prepară prin diluarea a 200 ml soluţie de acid sulfuric N/10 la 1000 ml cu apă distilată. Se stabileşte factorul soluţiei de acid sulfuric N/50 cu ajutorul soluţiei titrate de hidroxid de sodiu N/50.

6.Soluţie de hidroxid de sodiu N/50.Se obţine diluînd 200 ml soluţie de NaOH N/10 la 1000 ml cu apă distilată.Factorul soluţiei de NaOH N/50 se stabileşte cu ajutorul unei soluţii de acid oxalic N/50.Intr-un pahar Berzelius de 250 ml se măsoară cu ajutorul unei biurete 20 ml soluţie de acid oxalic,se adaugă 1-2 picături de soluţie alcoolică de fenolftaleină 1% şi se titrează cu soluţie de hidroxid de sodiu N/50 pînă la apariţia unei coloraţii slab roz persistente.Se calculează factorul soluţiei de hidroxid de sodiu.

7.Soluţie de roşu de metil ca indicator(pag.76).

Modul de lucru.Determinarea azotului total cuprinde trei etape succesive :

-mineralizarea preparatelor biologice ;
-distilarea amoniacului şi
-titrarea indirectă a amoniacului.

Mineralizarea preparatelor biologice.Intr-un balon Kjeldahl (fig.10.4) cu capacitatea de 50-100 ml se introduce o cantitate corespunzătoare de material de analizat,care să conţină 5-10 mg azot.Cantitatea optimă de material biologic necesară pentru analiză depinde de conţinutul acestuia în proteine şi se stabileşte în experienţe preliminare. Inainte de introducere în balon,materialul biologic se cîntăreşte la balanţa analitică într-o fiolă de cîntărire.Se trece cu atenţie conţinutul fiolei într-un balon Kjeldahl uscat,apoi se cîntăreşte fiola din nou.Diferenţa dintre prima şi cea de a doua cîntărire reprezintă greutatea probei luată pentru determinare.

Fig10.4.Balon Kjeldahl

In cazul lichidelor biologice volumul probei de analizat se măsoară cu ajutorul unei pipete.

In balonul Kjeldahl se adaugă 0,1-1,0g de amestec catalizator format din sulfat de potasiu şi sulfat de cupru(3:1) şi 1-5 ml acid sulfuric concentrat.Sulfatul de potasiu are rolul de a ridica temperatura de fierbere,iar sulfatul de cupru accelerează procesul de mineralizare a substanţei organice.Este preferabil să se introducă şi 2-3 perle de sticlă,pentru a evita formarea de bule în timpul mineralizării.

Mai pot fi utilizaţi drept catalizatori apa oxigenată,

mercurul metalic,seleniu etc.

In gura balonului se introduce o pîlnie mică sau un dop de sticlă,pentru a împedica pierderea vaporilor de acid sulfuric. Apoi balonul se montează în poziţie oblică într-un stativ metalic sub nişă şi se încălzeşte cu grijă pe sită de azbest la flacăra unui bec de gaz.In cazul analizelor în serie,încălzirea se poate face pe suportul comun, prezentat în fig.10.5.Dacă laboratorul de cercetări nu este prevăzut cu nişă,atunci se poate utiliza un suport comun care să asigure completa evacuare a gazelor rezultate(fig.10.6).

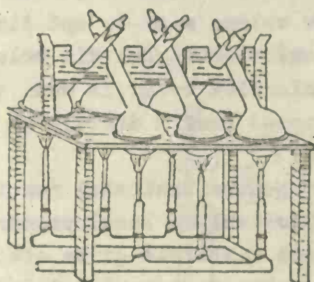


Fig.10.5.Suport pentru baloanele Kjeldahl,folosit în cazul analizelor în serie

In decursul primelor minute de încălzire,conţinutul balonului devine negru şi spumos.Pentru evitarea pierderii probelor se recomandă ca încălzirea să fie efectuată treptat.După ce conţinutul a încetat să spumeze,se intensifică încălzirea şi se continuă pînă ce lichidul din balon devine incolor sau uşor colorat în albastru,datorită sulfatului de cupru.Dacă pe pereţii balonului s-au depus particule de sub-

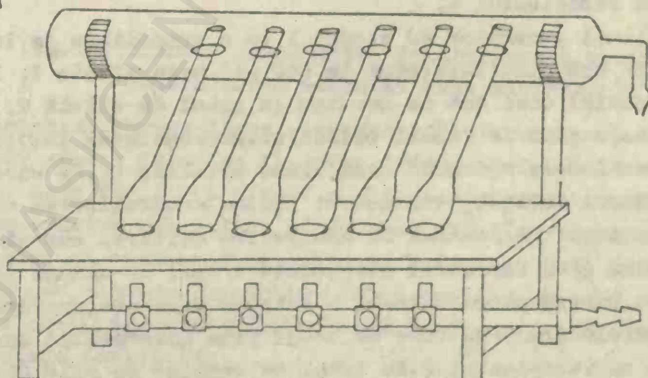


Fig.10.6

stanţă carbonizată,atunci se spală cu ajutorul amestecului fier-

binte,rotind cu atenţie balonul,după care lichidul este supus unei încălziri suplimentare.Durata mineralizării este de aproximativ 8 ore în funcţie de natura materialului biologic supus analizei,fiind mai mare pentru proteinele cu un conţinut ridicat de lizină(12 ore).După terminarea mineralizării,balonul Kjeldahl se răceşte prin adăugare de puţină apă distilată(5 ml),se agită şi conţinutul lui se trece într-un balon cotat de 100 ml.Pentru a antrena întreaga cantitate de mineralizat din balonul Kjeldahl, pereţii acestuia se spală de 2-3 ori cu volume mici de apă distilată(5-10 ml),care se adaugă,de asemenea,la amestecul din balonul cotat.Apoi se completează conţinutul balonului cotat la semn cu apă distilată.Această soluţie se utilizează pentru distilarea amoniacului.

In paralel ,se face o probă martor pentru controlul reactivilor.In acest scop,într-un alt balon Kjeldahl în locul preparatului biologic se ia un volum egal de apă distilată şi se efectuează aceleaşi operaţii descrise pentru proba cu material de analizat.

Distilarea amoniacului.A doua etapă-distilarea amoniacului se realizează într-un aparat de distilare Pregl,modificat de Parnas şi Wagner (fig.10.7).

Aparatul este constituit dintr-un balon generator de vapori 1,recipientul intermediar 2,un balon de tip Kjeldahl 3,refrigerentul 4 şi recipientul 5.

In balonul generator de vapori 1 cu o capacitate de 1000 ml se introduce apă distilată(pînă la 650 ml) prin pîlnia P_1 legată prin intermediul unui tub de cauciuc la tubul de sticlă T_1,care ajunge aproape pînă la fundul balonului.Extremitatea tubului T_1 poate fi închisă cu ajutorul unei cleme metalice C_1.Se adaugă cîteva picături de H_2SO_4 concentrat pentru neutralizarea amoniacului ce ar putea fi prezent în apă.Pentru evitarea supraîncălzirii balonului şi a fierberii neregulate a apei se adaugă cîteva bucăţele de piatră ponce.Balonul 1 este,de asemenea,prevăzut cu tubul de sticlă scurt T_2 care se leagă prin intermediul unui tub de cauciuc cu recipientul 2.Pe tubul de cauciuc se află fixată clema C_2.

Recipientul intermediar 2 are în porţiunea lui superioară un

dop cu tub de sticlă pentru legătura cu generatorul de vapori şi un tub de derivaţie pentru admiterea aburului în balonul 3. Capătul inferior al recipientului 2 se termină cu un orificiu de evacuare, pe care se îmbracă un tub de cauciuc prevăzut cu clema C_3. Recipientul intermediar 2 serveşte la spălarea aparatului.

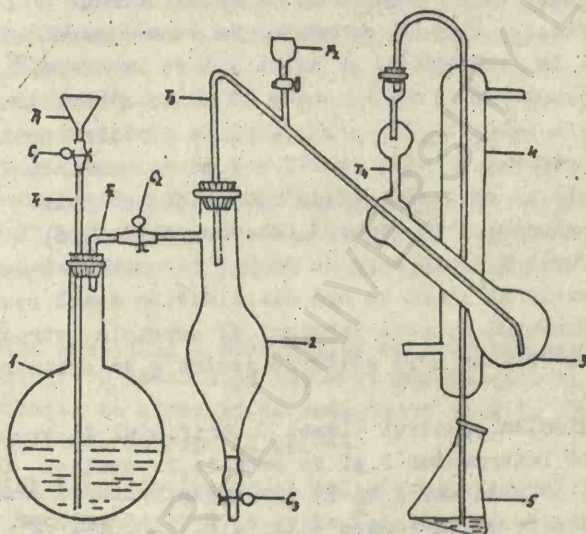


Fig.10.7. Schema instalaţiei Parnas-Wagner pentru determinarea azotului după micrometoda Kjeldahl

Aparatul Parnas-Wagner trebuie spălat cu vapori de apă timp de 15-20 minute înaintea fiecărei determinări. Dacă montarea aparatului este realizată recent şi în acest scop s-au utilizat tuburi de cauciuc noi pentru asamblarea părţilor componente ale aparatului se recomandă ca spălarea lui să se facă timp de minimum 6-8 ore, deoarece tuburile noi de cauciuc, la cald, pun în libertate cantităţi apreciabile de azot care pot influenţa negativ rezultatele analizelor.

Balonul 3 comunică prin intermediul unui tub de sticlă T_3 cu recipientul intermediar 2, iar prin tubul T_4 cu refrigerentul 4.

Prin pîlnia cu robinet P_2,cu care este prevăzut tubul T_3 al acestui balon,se introduc reactivii şi mineralizatul.

Recipientul 5,care conţine o cantitate cunoscută de soluţie titrată de acid sulfuric,serveşte la captarea amoniacului distilat.

Pentru distilarea amoniacului rezultat în urma mineralizării substanţei organice se procedează în felul următor :

Se încălzeşte balonul generator de vapori,deschizînd clema C_2 a tubului de legătură T_2 şi orificiul de evacuare C_3 al recipientului intermediar 2.Se introduc 10 ml de mineralizat din balonul cotat în balonul 3 al aparatului de distilat prin pîlnia P_2.Se spală pereţii pîlniei de 2-3 ori cu volume mici de apă distilată(2-3 ml) şi apoi se închide robinetul acesteia.

In recipientul 5 se măsoară,folosind o biuretă,10 ml soluţie de acid sulfuric N/50 la care se adaugă 3-4 picături de soluţie de roşu de metil şi 10 ml de apă distilată.Se aşază recipientul 5 sub refrigerentul 4,tubul terminal al acestuia introducîndu-se în soluţia titrată de acid sulfuric pentru a se evita pierderea amoniacului.

Se închide,cu ajutorul clemei C_3,orificiul de evacuare al recipientului intermediar 2 şi se permite,în acelaşi timp,trecerea vaporilor prin tubul T_3 în balonul 3.

In pîlnia P_2 se introduce soluţie de NaOH 33%(la 1 ml de H_2SO_4 concentrat 5 ml soluţie de NaOH 33%),apoi se deschide robinetul pîlniei şi acesta se reînchide înainte ca întreaga cantitate de soluţie de hidroxid să se fi scurs în balonul 3.Schimbarea culorii verde-deschis a mineralizatului în albastru,datorită formării hidroxidului de cupru,indică că reacţia lichidului din balonul 3 este alcalină.Vaporii de apă trecînd prin mineralizatul alcalinizat antrenează amoniacul care se degajă şi este captat în soluţia titrată de acid sulfuric.

Distilarea durează 10-15 minute.In decursul ultimelor 5 minute partea inferioară a refrigerentului nu trebuie să se afle în contact cu soluţia de acid sulfuric,coborîndu-se în acest scop recipientul 5.După terminarea distilării,capătul inferior al refrigerentului,care a fost în contact cu soluţia de acid sulfuric,se spală cu volume mici de apă distilată,care se adaugă în

recipientul 5.

Se procedează similar şi cu proba martor, după ce, în prealabil se spală aparatul de distilare.

Pentru spălarea aparatului, imediat după terminarea distilării se îndepărtează flacără, se închide clema C_2 a tubului de legătură dintre balonul generator de vapori 1 şi recipientul 2. Datorită răcirii rapide a recipientului intermediar 2, lichidul din balonul 3 sifonează în recipientul 2. Inainte de a evacua lichidul din recipientul 2 prin deschiderea clemei C_3, în balonul 3 se introduce apă distilată pentru spălare. Dacă apele de spălare nu sifonează odată cu deversarea la canal a lichidului din recipientul 2, atunci se închide clema C_3 şi se permite trecerea vaporilor de apă. După încălzire, apele de spălare se aduc în recipientul 2 pe calea descrisă pentru mineralizat. Spălarea se repetă de 2-3 ori.

Titrarea indirectă a amoniacului. Se titrează excesul de acid sulfuric N/50 rămas după captarea amoniacului în recipientul 5 cu soluţie de hidroxid de sodiu N/50 pînă la virarea coloraţiei soluţiei de la roşu la galben.

Calculul rezultatelor. Un ml soluţie de hidroxid de sodiu exact N/50 corespunde la 0,28 mg de azot. Conţinutul procentual de azot(N%) în preparatul biochimic cercetat se calculează după formula :

$$Ng\% = \frac{(V - v).F.0,28.100.100}{n.p.1000},$$

unde : V - ml soluţie de hidroxid de sodiu N/50 consumaţi pentru titrarea acidului sulfuric în proba de control(proba martor) ;

v - ml soluţie de hidroxid de sodiu N/50 merşi la titrarea excesului de acid sulfuric din proba de analizat;

F - factorul soluţiei de NaOH stabilit cu ajutorul acidului oxalic ;

p - greutatea(sau volumul) probei de preparat biologic luat pentru determinare ;

n - ml mineralizat luaţi pentru distilare.

Importanța practică. Intre compușii chimici azotați prezenți în țesuturile vii predomină, din punct de vedere cantitativ, proteinele. De aceea, prin determinarea conținutului de azot total se pot trage concluzii asupra cantității de proteine în țesutul animal sau vegetal cercetat. Se cunoaște că proteinele conțin o cantitate determinată de azot, care reprezintă în medie 16%. Deci fiecare gram de azot determinat corespunde la 6,25 grame de proteine. Această valoare cunoscută sub denumirea de coeficient proteic sau factor de conversie variază după natura proteinelor, respectiv după originea preparatului biologic analizat : nutrețuri și leguminoase-6,25 ; semințe de cereale-5,71; semințe de oleaginoase-5,30; lapte-6,38 etc. Inmulțind conținutul procentual de azot găsit cu valoarea coeficientului proteic se află cantitatea procentuală a așa-numitei proteine brute.

10.2.1.2. DETERMINAREA AZOTULUI PROTEIC

Așa cum s-a arătat, produsele animale și vegetale conțin alături de substanțele proteice propriu-zise, și alte combinații azotate neproteice. Uneori este suficient să se determine numai cantitatea azotului total, care intră în compoziția tuturor combinațiilor azotate proteice și neproteice. Insă în majoritatea cercetărilor biochimice este necesar să cunoaștem conținutul real al substanțelor proteice, determinînd separat numai azotul corespunzător proteinelor (azotul proteic).

Principiul metodei. Pentru determinarea azotului proteic, proteinele se separă de alte combinații prin precipitare, apoi precipitatul proteic se mineralizează cu H_2SO_4 în prezență de catalizatori și se determină conținutul azotului după micrometoda Kjeldahl.

Reactivi. 1. Reactivii 1-7 utilizați la determinarea azotului total.

2. Soluție de acid tricloracetic 50%.

3. Soluție de acid tricloracetic 2%.

Modul de lucru. O cantitate de material biologic fărîmițat fin, care să conțină 3-5 mg azot proteic, se introduce într-un

pahar de 100 ml.Se adaugă 25 ml de apă distilată şi se încălzeşte pînă la fierbere,agitînd conţinutul paharului cu o baghetă de sticlă.In cazul materialelor vegetale bogate în amidon(seminţe de cereale,leguminoase,cartofi),conţinutul paharului se încălzeşte pe baia de apă,timp de 30 minute,la temperatura de 50-55°C,întrucît la o temperatură mai ridicată amidonul se transformă în clei şi îngreuiază filtrarea ulterioară.După încălzire se precipită proteinele cu soluţie de acid tricloracetic.Pentru aceasta se adaugă în pahar,prin agitare,5 ml soluţie de acid tricloracetic 50%.Se lasă în repaus timp de 30-40 minute şi conţinutul paharului se filtrează pe hîrtie de filtru cantitativă.Paharul şi precipitatul de pe filtru se spală de cîteva ori cu soluţie de acid tricloracetic 2%.

La terminarea filtrării,filtrul împreună cu pîlnia se usucă timp de 1-2 ore în termostat la 50-60°C.Cînd hîrtia de filtru începe să se desprindă uşor de pe pîlnie,filtrul împreună cu precipitatul se introduce într-un balon Kjeldahl,în care se măsoară apoi 5-7 ml de H_2SO_4 concentrat,se adaugă 1 g de amestec catalizator format din K_2SO_4 şi $CuSO_4$(3:1) şi se mineralizează.Mineralizarea,distilarea amoniacului şi calculul rezultatelor se efectuează în modul descris la determinarea azotului total.

Rezultatele determinării azotului proteic se exprimă,de obicei,în procente la substanţa uscată.

10.2.2.DOZAREA PROTEINELOR CU REACTIVUL FOLIN-CIOCÂLTEU(METODA LOWRY)

Principiul metodei.Metoda se bazează pe reacţia proteinelor cu ionii de cupru în mediu alcalin,rezultînd proteinatul de cupru care reduce reactivul Folin-Ciocalteu cu formarea unui produs de culoare albastră.Metoda Lowry se foloseşte pe scară largă pentru determinarea proteinelor în soluţii cu concentraţii cuprinse între 10 şi 100 micrograme.

Reactivi.1.Soluţie de Na_2CO_3 2% în soluţie de NaOH 0,1 N.
2.Soluţie de $CuSO_4.5H_2O$ 1%.
3.Soluţie de tartrat de sodiu sau potasiu 2%.

4.Soluţie de lucru.In momentul întrebuinţării se amestecă 50 ml reactiv 1 cu 0,5 ml reactiv 2 şi 0,5 ml reactiv 3.

5.Reactiv Folin-Ciocâlteu concentrat(pag.104).Reactivul concentrat este stabil un timp îndelungat.

6.Reactiv Folin-Ciocâlteu diluat.Inainte de întrebuinţare se amestecă 1 ml reactiv concentrat cu 2 ml apă distilată.

7.Soluţie etalon de albumină serică umană sau bovină 10mg/100 ml.

Modul de lucru. La 1 ml soluţie proteică conţinînd 10-100 micrograme de proteine se adaugă 5 ml soluţie de lucru(reactiv 4). Se agită şi se lasă să stea 10 minute la temperatura camerei.Apoi amestecul se tratează cu 0,5 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat (reactiv 6), se agită bine şi se lasă în repaus la temperatura camerei.După 30 minute se citeşte extincţia probei la 500 nm(filtru verde) faţă de proba de control efectuată cu 1 ml apă distilată.Cantitatea de proteină în proba de cercetat se află pe curba de etalonare.

Pentru construirea curbei etalon se foloseşte o soluţie de albumină serică umană sau bovină,obţinută prin dizolvarea a 10mg albumină în 100 ml apă distilată.Din această soluţie de albumină se fac diluţii conform tabelului 10.2.

Tabelul 10.2.

Construirea curbei etalon pentru dozarea proteinelor prin metoda Lowry

Concentraţia de proteină în probă(micrograme)	Soluţie de albumină (ml)	Apă distilată(ml)	Observaţie
0	0	1,0	Control
10	0,1	0,9	Probă
20	0,2	0,8	Probă
40	0,4	0,6	Probă
60	0,6	0,4	Probă
80	0,8	0,2	Probă
100	1,0	0	Probă

In probele etalon se determină concentraţia de proteină după metodica descrisă. Cu datele obţinute se trasează curba etalon.

Calculul rezultatelor. Raportînd extincţia probei de cercetat la curba etalon se află microgramele de proteină corespunzătoare acestei valori. Apoi se calculează cantitatea de proteină (mg sau g) într-un ml soluţie sau lichid biologic de cercetat. La calcul se va ţine cont de eventuala diluţie a lichidului biologic sau a soluţiei analizate. In cazul extractelor tisulare se vor exprima rezultatele în mg de proteină solubilă la 1 g ţesut.

Observaţii. 1. In cazul lichidelor biologice şi extractelor enzimatice cu un conţinut ridicat de proteine se va face diluţia corespunzătoare cu apă distilată.

2. Pentru cantităţile mici de proteine în probă se recomandă să se colorimetreze probele la 750 nm (filtru roşu).

10.2.3. DOZAREA PROTEINELOR TOTALE IN SERUL SANGUIN PRIN METODA REFRACTOMETRICA

Cînd o rază de lumină trece dintr-un mediu cu densitatea optică mai mică în altul cu densitatea optică mai mare, ea suferă o deviere numită refracţie. Raportul dintre sinusul unghiului de incidenţă (i) al razei şi sinusul unghiului ei (r) de refracţie se numeşte indice de refracţie. Obişnuit, se alege ca mediu de referinţă aerul, iar indicele de refracţie al diferitelor substanţe în raport cu aerul se notează cu n :

$$n = \frac{\sin i}{\sin r}$$.

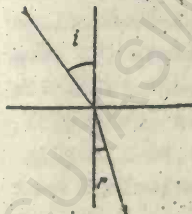


Fig. 10.8. Trecerea unei raze de lumină dintr-un mediu în altul

Valoarea indicelui de refracţie depinde de cantitatea şi natura substanţei cercetate, de temperatura mediului extern, de lungimea de undă a luminii folosite etc.

Principiul metodei. Indicele de refracţie a serului este proporţional cu cantitatea de proteine pe care le conţine. Cunoscînd

valoarea indicelui de refracţie se poate calcula cantitatea de proteine din serul sanguin dat.

Determinarea indicelui de refracţie se efectuează cu ajutorul aparatelor numite refractometre.

Dintre numeroasele refractometre se va descrie unul din cele mai răspîndite şi anume aparatul de tip Abbé.

Refractometrul Abbé(fig.10.9) este format din două prisme identice din sticlă specială : prisma de iluminare(2) şi prisma de măsurare(3).Fiecare prismă este prinsă într-un manşon metalic nichelat prin care circulă apă destinată menţinerii aparatului la temperatura necesară determinării.Cele două prisme sînt dispuse una în faţa celeilalte şi se pot depărta sau apropia.Atunci cînd sînt cel mai apropiate,între prisme rămîne un mic spaţiu,în care se introduce substanţa de analizat.Prismele se menţin în această poziţie în timpul determinărilor cu ajutorul şurubului (13).Prisma inferioară(2) este mobilă,are suprafaţa,care vine în contact cu substanţa de cercetat, mată şi serveşte pentru a primi lumina de reflecţie de la oglinda (1).Prisma (3) este fixă şi are faţa,care vine în contact cu substanţa de cercetat,lustruită.Blocul cuprinzînd cele două prisme este cuplat cu alidada (5) care se mişcă în faţa sectorului fix (7).La sectorul (7) este prinsă luneta(4) şi scara gradată(8) cu indicii de refracţie(cuprinşi între valorile 1,30-1,70).In cîmpul lunetei există două fire reticulare perpendiculare unul pe altul(fig.10.10).

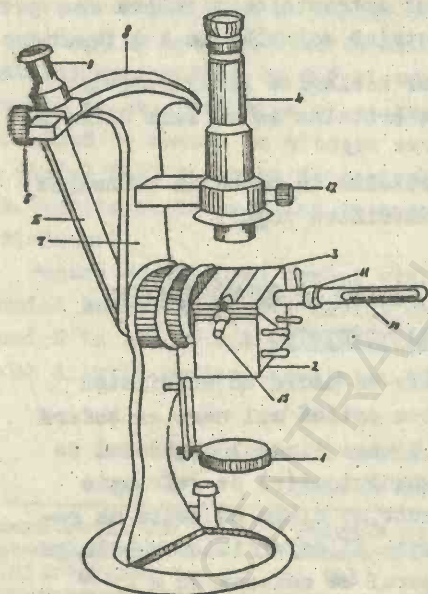


Fig.10.9.Refractometrul Abbé

Refractometrul Abbé funcţionează după următorul principiu : raza de lumină de la oglinda (1) trece prin prisma de iluminare

(2),străbate stratul lichidului de cercetat şi prisma de măsurare(3),apoi intră în luneta (4).In ocularul lunetei se vede un cîmp luminat(fig.10.11,a).Complexul prismelor poate fi rotit cu ajutorul butonului (6) şi al alidadei (5) în aşa fel încît într-o anumită poziţie are loc reflexia interioară totală a razei de lumină pe suprafaţa lichidului de cercetat şi în ocularul lunetei apare un cîmp,pe jumătate luminat,pe jumătate întunecat(fig.10.11.b).Unghiul de rotire al prismelor depinde de indicele de refracţie al lichidului de cercetat.Cînd limita de separaţie dintre cîmpul luminat şi cel întunecat se suprapune pe intersecţia firelor reticulare,se citeşte indicele de refracţie pe scara (8),în formă de arc.Pentru citirea valorii indicelui de refracţie cu precizie pînă la a patra zecimală se foloseşte lupa (9).In timpul determinării indicelui de refracţie prin mangoanele metalice ale prismelor circulă apa de termostatare a cărei temperatură se controlează cu termometrul (10) fixat în ştuţul (11).

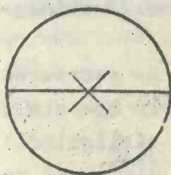


Fig.10.10.Firele reticulare şi linia de demarcare în cîmpul lunetei

O particularitate a refractometrului Abbé constă în utilizarea luminii albe la măsurători.In acest caz,datorită dispersiei,în ocularul lunetei(4),în locul unei limite de separaţie nete între cîmpul luminat şi cel întunecat se obţine o bandă spectrală irizată,neclară.Pentru înlăturarea acestui efect se foloseşte compensatorul de dispersie fixat în partea inferioară a tubului lunetei. Compensatorul de dispersie constă din două prisme Amici,care se rotesc în direcţii opuse cu ajutorul butonului (12).Prin rotirea acestor prisme se ajunge la

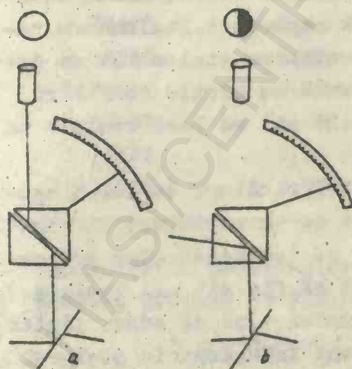


Fig.10.11.Schema refractometrului Abbé

limita de separaţie netă a cîmpului.

<u>Modul</u> <u>de</u> <u>lucru</u>.Se termostatează aparatul,trecînd prin manşonul metalic un curent de apă,care se potriveşte în aşa fel încît,temperatura dorită să se menţină tot timpul determinărilor. După ce temperatura necesară a fost atinsă,se roteşte sectorul refractometrului împreună cu alidada(5) către oglinda cu suport, pînă ce planul de separaţie al prismelor ajunge aproape orizontal.

Inainte de începerea determinărilor indicelui de refracţie al lichidului biologic analizat,se execută etalonarea aparatului. Pentru aceasta se deschid prismele prin învîrtirea cîrligului(13), se lasă să cadă dintr-o pipetă 1-2 picături de apă distilată pe suprafaţa prismei de iluminare,apoi se închide cu atenţie blocul prismelor.Reperul scării(8) se potriveşte la valoarea 1,333. Cu ajutorul butonului (12) al compensatorului de dispersie se elimină coloraţia limitei de separaţie dintre cele două jumătăţi ale cîmpului optic din luneta(4).Dacă se constată că intersecţia firelor reticulare este deplasată,faţă de limita de separaţie, atunci ea se potriveşte pe această limită cu ajutorul cheii ataşate la aparat.In acest scop se introduce cheia în orificiul de pe corpul lunetei şi se roteşte încet pînă la suprapunerea intersecţiei firelor reticulare cu limita de separaţie.Etalonarea refractometrului se face la 20°C.După terminarea etalonării se deschide blocul prismelor,feţele lor se usucă cu hîrtie de filtru şi se şterg cu vată îmbibată cu alcool.Blocul se lasă deschis un anumit timp pentru uscare.

După aceasta se pun între prisme 2-3 picături de ser sanguin şi se închid repede.Temperatura apei de termostatare se reglează la 37°5.Prin rotirea oglinzii(1) se luminează clar prismele,astfel încît cîmpul vizual în lunetă să fie cît mai luminos. Dacă este necesar,se mişcă butonul alidadei pînă se aduce limita de separaţie dintre cîmpul luminat şi cel întunecat în ocularul lunetei.Dacă limita de separaţie este colorată,se roteşte butonul compensatorului pînă se obţine o limită de separaţie clară.Cu ajutorul butonului (6) al alidadei (5) se aduce limita de separaţie pe intersecţia firelor reticulare.Se citeşte pe scara (8)

cu ajutorul lupei (9) indicele de refracţie al serului respectiv. Se ia media a 2-3 citiri.

După fiecare determinare se deschid prismele,se usucă cu o hîrtie de filtru şi se curăţă suprafaţa cu vată îmbibată cu alcool.Apoi se spală cu alcool sau eter introducîndu-se cîteva picături de solvent între prisme.După spălare prismele se şterg din nou şi se lasă deschise un anumit timp pentru uscare.

Calculul rezultatelor.Pentru calcularea conţinutului de proteine,exprimat în grame,în 100 ml ser sanguin se foloseşte tabelul 10.3.

Tabelul 10.3

Conţinutul în proteine corespunzător indicelui de refracţie la 37°5 la refractometrul Abbé

Indice de refracţie	Cantitatea de proteine,%	Indice de refracţie	Cantitatea de proteine,%
1,34388	4,60	1,34798	6,98
1,34426	4,81	1,34836	7,20
1,34463	5,03	1,34873	7,42
1,34500	5,25	1,34910	7,69
1,34537	5,47	1,34947	7,85
1,34575	5,68	1,34984	8,06
1,34612	5,90	1,35021	8,29
1,34650	6,12	1,35058	8,49
1,34687	6,34	1,35095	8,71
1,34724	6,55	1,35132	8,92
1,34761	6,77	1,35169	9,14

Concentraţia proteinelor serice se poate calcula şi cu ajutorul formulei propusă de F.W.Sunderman(1966) :

$$P = 533,6(RI_S - RI_{H_2O}) -1,89 \quad ,$$

unde : P - concentraţia proteinelor(g/100 ml ser) ;

RI_S - indicele de refracţie al serului şi

RI_{H_2O} - indicele de refracţie al apei.

(RI_S şi RI_{H_2O} se determină la aceeaşi temperatură).

Valori fiziologice. Valorile normale ale concentraţiei proteinelor în serul sanguin al adulţilor variază între limitele 6,5-8,5 %, la copii pînă la 6 ani între 5,6-8,5% şi la nou-născuţi: 5,3-8,9%.

Variaţii patologice. Valori crescute ale proteinemiei se observă în deshidratări acute produse de vărsături, diaree, diabet, mielom multiplu, anemie pernicioasă, infecţii acute şi cronice.

Scăderea proteinemiei (hipoproteinemia) se întîlneşte în : afecţiunile hepatice, stările de şoc produse de arsuri, hemoragii, în afecţiunile renale.

10.2.4. ANALIZA PROTEINELOR CU AJUTORUL ELECTROFOREZEI PE HIRTIE

Electroforeza pe hîrtie se folosește pentru studiul calitativ și cantitativ al amestecurilor de proteine, al proteinelor din serul sanguin, urină, lichidul cefalorahidian și lichidele tisulare.

SEPARAREA SI DETERMINAREA CANTITATIVA A PROTEINELOR DIN SERUL SANGUIN PRIN METODA ELECTROFOREZEI PE HIRTIE

Principiul metodei. Componentele amestecului de proteine serice, adsorbite pe hîrtia de electroforeză imbibată cu soluție tampon avînd pH 8,6, migrează sub influența unui cîmp electric constant în direcția anodului și se separă în fracțiuni care se eșalonează de-a lungul hîrtiei, în dependență de mărimea moleculelor și valoarea sarcinii electrice a fiecărei fracțiuni.

Pentru punerea în evidență a fracțiunilor proteice separate, hîrtia uscată se introduce într-o baie de colorant. După ce se spală excesul de colorant, pe hîrtie apar diferitele fracțiuni proteice separate sub formă de spoturi colorate. Se obține astfel o electroforegramă.

Cantitatea de colorant legat de o fracțiune proteică corespunde aproximativ conținutului din fracțiunea respectivă. Pentru determinarea cantitativă a conținutului relativ de proteină în fiecare fracțiune izolată există două procedee: fotometrarea directă a electroforegramei și eluarea spoturilor cu fiecare fracțiune, urmată de colorimetrarea probei.

In cazul primului procedeu se folosesc aparate speciale numite densitometre. Prin trecerea constantă a electroforegramei prin fața fantei luminoase a densitometrului, se trasează o curbă a extincțiilor corespunzătoare spoturilor colorate dispuse unul după altul.

In lipsa densitometrului, fiecare spot colorat se decupează de pe electroforegramă și se eluează colorantul fixat pe acest fragment cu o soluție alcalină. Intensitatea culorii eluatului se determină colorimetric.

Serul sanguin conține un amestec complex de proteine. Cu ajutorul electroforezei pe hîrtie proteinele serului sanguin se

separă în 5 fracţiuni : albumine şi globulinele α_1, α_2, β, γ.

Reactivi. 1. Soluţie tampon de veronal-medinal cu pH 8,6. Se dizolvă 10,33 g medinal (barbital de sodiu) în 300 ml apă distilată într-un pahar Berzelius de 500 ml. După dizolvarea medinalului în pahar se introduc 1,84 g veronal (barbital sau acid dietilbarbituric) şi, agitînd, se încălzeşte pe baie pînă la dizolvarea lui completă. Soluţia se răceşte la temperatura camerei şi se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml. Paharul se spală de mai multe ori cu apă distilată care se toarnă în balonul cotat. Se completează la semn cu apă distilată şi se verifică pH-ul soluţiei.

In lipsa medinalului se poate înlocui această soluţie tampon cu soluţia tampon D indicată la pag. 57.

2. Soluţie de albastru de bromfenol. Se dizolvă 10 g sulfat de zinc cristalizat în 190 ml apă distilată, se adaugă 10 ml acid acetic glacial şi 0,020 g albastru de bromfenol. Se agită şi se lasă la temperatura camerei timp de 24 ore pentru dizolvarea completă a colorantului.

3. Soluţie de acid acetic 2%.

4. Soluţie de acetat de sodiu cristalizat 2% în acid acetic 10%.

5. Soluţie de hidroxid de sodiu 0,01 N.

Modul de lucru. Aparatul pentru electroforeza pe hîrtie. In prezent există mai multe tipuri de aparate pentru electroforeza pe hîrtie. Indiferent de particularităţile lor constructive, principiul de funcţionare este acelaşi, iar modul de lucru se aseamănă de la un aparat la altul.

Mai departe se descrie, în general, aparatul românesc standard de electroforeză pe hîrtie. Acest aparat este compus din redresorul de curent şi camera de electroforeză.

Redresorul se alimentează de la reţeaua de curent alternativ (220V) şi poate să debiteze un curent continuu, cu o tensiune variabilă între 0 şi 500 V şi cu intensitatea curentului pînă la 50 mA.

Camera de electroforeză este construită din material plastic rezistent la acizi. Schema camerei de electroforeză este prezentată

în fig.10.12. Camera de electroforeză este alcătuită dintr-un bac care are lateral 2 recipiente pentru soluţia tampon reunite printr-o punte centrală. Fiecare recipient este împărţit printr-un perete despărţitor cu orificii de comunicaţie în două compartimente. Compartimentele dinspre interior sînt divizate în trei sectoare mici prin intermediul a doi pereţi transversali, de asemenea, cu orificii de comunicaţie, care realizează un sistem de praguri destinat să reducă difuzia produselor rezultate în timpul electroforezei. In cele două sectoare mici, situate în diagonală se află montat cîte un electrod metalic.

Puntea centrală are pe una din laturi un şanţ puţin adîncit care serveşte la egalizarea nivelului soluţiei tampon din cele două recipiente.

Camera se acoperă cu un capac avînd faţa din material transparent şi prevăzut cu o fantă longitudinală, de 5 mm lăţime, aşezată la distanţă potrivită pentru a permite aplicarea probelor de cercetat pe benzile de hîrtie. Acestea se fixează în aparat pe o ramă, capetele benzilor fiind introduse în compartimentele dinspre exterior.

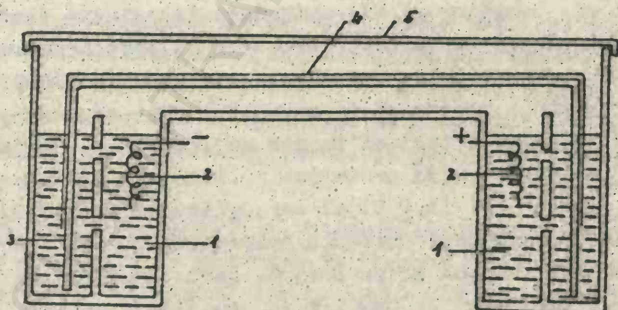


Fig.10.12. Schema camerei de electroforeză

1-Recipiente pentru soluţia tampon ; 2-Electrozi metalici ; 3-Ramă pentru benzile de hîrtie ; 4-Hîrtie de electroforeză ; 5-Capacul camerei.

<u>Electroforeza</u>. In fiecare recipient al camerei de electroforeză se introduc 220 ml soluţie tampon şi se realizează egalizarea nivelului în cele patru compartimente, prin înclinarea uşoară a bacului în direcţia şanţului transversal de la unul din capetele punţii sau cu ajutorul unui sifon de sticlă. Camera de electroforeză trebuie să fie aşezată în poziţie perfect orizontală.

Din hîrtie cromatografică Whatman nr.1 sau Schleicher-Schüll nr.2043b se taie benzi cu latura de 4 cm şi lungimea de 32 cm. Pe fiecare bandă de hîrtie se marchează cu ajutorul unui creion negru două repere care vor indica lăţimea ramei şi linia de start (2 cm)-locul unde se va aplica proba de ser. Linia de start se va trasa la distanţa de 9,7 cm de la capătul benzii de hîrtie ce se va introduce în recipientul corespunzător catodului.

Apucînd benzile de hîrtie de cele două capete, se introduc în soluţie tampon care se află într-o cuvă metalică emailată sau într-o cutie Petri. Excesul de soluţie de pe benzi se îndepărtează ţinîndu-se cîteva secunde vertical.

Benzile de hîrtie se întind perpendicular şi uniform pe părţile laterale ale ramei, lăsînd între ele un spaţiu de 2-3 mm. Rama cu benzile de hîrtie se plasează în bac, în aşa fel încît ambele extremităţi ale benzilor să fie cufundate în soluţia din compartimentele exterioare corespunzătoare. Apoi se aplică pe locurile dinainte marcate probele de ser. Cantitatea proteinelor în serul sanguin cercetat se determină în prealabil prin metoda refractometrică. Concentraţia proteinei în ser nu trebuie să fie sub 2%. In funcţie de concentraţia proteinei pe linia de start se depune o cantitate de la 0,01 la 0,02 ml ser. Aplicarea serului, de regulă, se efectuează cu ajutorul unei micropipete. Camera de electroforeză se acoperă cu capacul şi se închide fanta longitudinală a acestuia cu obturatorul de cauciuc. Se conectează bornele electrozilor la redresorul de curent. Se deschide circuitul electric, asigurînd un curent de 0,1-0,5 mA pentru fiecare un cm lăţime a benzii de hîrtie. Intensitatea şi forţa curentului sînt variabile în funcţie de natura şi pH-ul soluţiei tampon, de lungimea şi lăţimea hîrtiei cromatografice utilizate, de calitatea acesteia, de grosimea ei şi de temperatura la care se realizează separarea proteinelor. Dacă în camera de electroforeză se aşază mai multe benzi

cromatografice,intensitatea curentului este în funcţie de numărul acestora.Este contra indicată folosirea unui curent prea puternic,deoarece în acest caz are loc o creştere a temperaturii hîrtiei şi o evaporare mai intensă a soluţiei tampon.Electroforeza se continuă 12-18 ore.

Aparatul se menţine pe toată durata experienţei într-o cameră cu temperatura constantă(18-25°C).

După terminarea electroforezei,se întrerupe curentul,se scot benzile cromatografice din cameră(folosindu-se o pensă curată) şi se usucă la aer,apoi într-un termostat la 90-100°C timp de 15-20 minute pentru fixarea proteinelor pe hîrtie.

Colorarea electroforegramelor.Benzile de hîrtie uscate se introduc timp de 30 minute într-o cuvă cu soluţie de albastru de bromfenol,care trebuie să le acopere în mod egal.Colorantul se îndepărtează,iar benzile se spală de 3 ori,cîte 5-10 minute, în băi cu soluţie de acid acetic 2%.Final benzile se introduc, timp de două minute,într-o soluţie de acetat de sodiu 2% în acid acetc 10%.Benzile se usucă în aer sau în termostat la 80°C.

După developare,pe benzile de hîrtie cromatografică apar cel puţin 4 spoturi colorate,care corespund albuminelor,alfa-, beta- şi gama-globulinelor.La pH 8,6 ,aceste proteine migrează în direcţia anodului,deoarece în condiţiile experimentale de mai sus,ele posedă sarcini electronegative.Viteza de migrare este diferită şi în ordinea distanţei faţă de anod sînt repartizate astfel : albumine,alfa-globuline,beta- şi gama-globuline.(fig. 10.13).

Determinarea cantitativă a fracţiunilor proteice.Pentru determinarea cantităţii de proteină în fiecare fracţiune izolată electroforetic se utilizează metoda eluţiei.Spoturile colorate, corespunzătoare diferitelor fracţiuni proteice,se decupează de pe electroforegramă tăind pe locul cel mai puţin colorat dintre ele.Fiecare fîşie conţinînd spotul colorat este tăiată în bucăţi subţiri(2 mm),care se introduc într-o eprubetă.In fiecare eprubetă se măsoară cu pipeta 3-5 ml soluţie de NaOH 0,01 N,în funcţie de suprafaţa şi intensitatea spoturilor colorate.In cazul fracţiunii albuminice se poate folosi o cantitate dublă de

eluant(comparativ cu celelalte fracţiuni),motiv pentru care extincţia eprubetei conţinînd această fracţiune se va înmulţi cu 2. Drept control serveşte un fragment de electroforegramă pe care,în urma colorării,nu s-a pus în evidenţă proteina.Conţinutul eprubetelor se agită cu atenţie şi se lasă la întuneric 30 minute.

Extincţia soluţiilor colorate,astfel obţinute,se măsoară la un fotoelectrocolorimetru,utilizînd lungimea de undă de 550 nm (filtru verde) şi controlul pentru compensare.

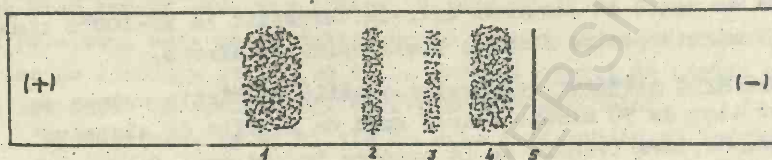


Fig.10.13.Electroforegrama proteinelor serice : 1-albumine;2-alfa-globuline;3-beta-globuline;4-gama-globuline;5-linia de start.

<u>Calculul</u> <u>rezultatelor</u>.Aflînd valorile extincţiilor corespunzătoare fracţiunilor proteice,se sumează aceste valori şi luînd suma lor ca 100%,se poate calcula conţinutul procentual relativ de proteină în fiecare fracţiune(X) după formula :

$$X = \frac{E_F \cdot 100}{\text{Suma extincţiilor}}$$

Trebuie reţinut că mult mai corectă se consideră exprimarea rezultatelor în procente absolute(g %) şi nu relative.Procentele absolute se obţin dacă suma extincţiilor tuturor fracţiunilor se raportează la concentraţia proteinelor totale ale serului sanguin. Atunci,efectuînd un calcul analog cu cel de mai sus se poate afla concentraţia reală a albuminelor şi fracţiunilor globulinice.

<u>Importanta</u> <u>practică</u>.Cercetarea raportului între fracţiunile proteice ale serului sanguin la om prezintă un mare interes clinic,în special pentru scopuri diagnostice.Determinarea fracţiunilor proteinelor serice la diferite animale are pe lîngă importanţă diagnostică şi una corelată cu dezvoltarea filogenetică şi poziţia sistematică a organismelor animale respective.

Scăderea albuminelor şi creşterea fracţiunii γ-globulinelor se întîlnesc în ciroze hepatice(albuminele, α- şi β-globulinele sanguine se sintetizează în ficat).In bolile rinichilor(nefrite, nefroză lipoidică),de asemenea,în intoxicaţiile cronice etc.,se observă scăderea albuminelor şi creşterea α_2- şi β-globulinelor.Diminuarea pronunţată a albuminelor şi sporirea tuturor fracţiunilor globulinice sînt caracteristice formării de tumori maligne.

In reumatismul cronic este crescut conţinutul de α-şi β-globuline.In cazul bolilor infecţioase creşte conţinutul γ-globulinelor.

10.2.5.EXTRACTIA SI DETERMINAREA FRACTIUNILOR PROTEICE DIN PLANTE

Proteinele joacă un rol deosebit în nutriţia omului şi animalelor.Valoarea nutritivă(alimentară) a diferitelor produse de origine vegetală sau animală depinde atît de cantitatea cît şi de calitatea proteinelor pe care le conţin.

In funcţie de compoziţia calitativă proteinele unor specii de plante se apropie după valoarea alimentară de proteinele de provenienţă animală,în timp ce valoarea proteinelor altor specii de plante poate fi foarte mică.Pentru aprecierea calităţii proteinelor există diferite procedee.

Unul din procedeele utilizate frecvent constă în determinarea fracţiunilor proteice separate din complexul proteic dat.In acest caz diversele grupe sau fracţiuni proteice(albumine,globuline,prolamine,gluteline) se extrag cu diferiţi solvenţi şi se determină cantitativ.Conţinutul fracţiunilor proteice în plante este deosebit.De exemplu,în seminţele leguminoaselor predomină globulinele,în seminţele cerealelor-prolaminele şi glutelinele, în organele vegetative ale plantelor se găsesc multe albumine, globuline şi gluteline.Chiar şi în limitele uneia şi aceleiaşi specii,compoziţia calitativă a proteinelor suferă modificări însemnate în dependenţă de condiţiile de cultură,însuşirile genetice etc.

Alt procedeu de apreciere a calităţii proteinelor se bazează

pe studierea compoziţiei lor aminoacidice.Plantele verzi pot sintetiza toţi aminoacizii,organismul uman şi animal fiind lipsit de această capacitate.Aminoacizii care nu pot fi sintetizaţi în organismul animal poartă numele de aminoacizi esenţiali(neînlocuibili).In prezent s-a stabilit că pentru om sînt esenţiali următorii 9 aminoacizi :triptofanul,fenilalanina,metionina,lizina,valina,treonina,leucina şi histidina,iar pentru animale încă şi arginina.Nutriţia cu o proteină neconţinînd unul din aceşti aminoacizi conduce la tulburarea metabolismului substanţelor şi îmbolnăvirea organismului animal.Prin furajarea animalelor cu diete neechilibrate pe linia compoziţiei în aminoacizi sau în cazul insuficienţei unuia din aminoacizii esenţiali în furaje se observă o creştere însemnată a consumului de hrană şi a preţului de cost al producţiei animaliere.Numeroase cercetări au stabilit că diferite fracţiuni proteice se diferenţiază în privinţa compoziţiei în aminoacizi.Astfel proporţia aminoacizilor esenţiali este mai mare în albumine,globuline şi gluteline şi mai scăzută în prolamine.De aceea un raport variat între aceste fracţiuni proteice va determina o anumită compoziţie în aminoacizi a proteinelor din produsul vegetal analizat.

In concluzie,rezultă că numai stabilindu-se conţinutul fracţiunilor proteice şi compoziţia lor în aminoacizi,se poate vorbi despre valoarea alimentară sau furajeră a unui produs.

Izolarea şi determinarea fracţiunilor proteice din seminţele de plante

Principiul metodei.Fracţionarea proteinelor vegetale se bazează pe solubilitatea diferenţiată a fracţiunilor proteice în diferiţi solvenţi.Proteinele din ţesuturile vegetale se extrag succesiv cu apă distilată(albumine),soluţii diluate de săruri neutre(globuline),alcool etilic(prolamine) şi soluţii alcaline(gluteline).In fiecare extract se determină conţinutul fracţiunii proteice corespunzătoare prin micrometoda Kjeldahl sau colorimetric.

Reactivi.1.Soluţie de NaCl 1 M.Se dizolvă 58,45 g NaCl în 1000 ml apă distilată.

2.Alcool etilic 80%.

3.Soluţie tampon borat 0,2 M cu pH 10,conţinînd 0,2% bisulfit de sodiu.

Modul de lucru.Intr-o eprubetă de centrifugă se cîntăreşte 1 g făină obţinută din seminţele plantei analizate şi se adaugă 10 ml apă distilată.Se agită timp de 60 minute şi se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min.Supernatantul se filtrează prin 2-3 straturi de tifon într-un balon cotat de 50 ml. Reziduul din eprubeta de centrifugă se extrage în condiţii identice încă de 4-5 ori cu cîte 10 ml de apă distilată.Supernatantele separate după centrifugare se toarnă în acelaşi balon cotat şi conţinutul se completează la semn cu apă distilată.Extractul obţinut constituie proteinele solubile în apă.

La reziduul rămas în eprubeta de centrifugă se adaugă 10 ml soluţie de NaCl 1M,se agită timp de 60 minute şi se centrifughează.Soluţia proteică separată se trece într-un balcn cotat de 50 ml.Materialul vegetal din eprubeta de centrifugă se prelucrează încă de 4-5 ori cu soluţie de NaCl 1 M.Extractul din balonul cotat se aduce la semn cu soluţie de NaCl.Fracţiunea obţinută reprezintă globuline extrase cu soluţie de NaCl.

După extracţia globulinelor,se separă fracţiunea proteică solubilă în etanol-prolamine.In acest scop reziduul din eprubetă se extrage de 4-5 ori cu alcool etilic 80%.De fiecare dată după adăugarea alcoolului,conţinutul eprubetei se agită timp de 60 minute,se centrifughează şi supernatantul se transvazează într-un balon cotat de 50 ml.Se completează la semn cu alcool.Extractele proteice alcoolice nu pot fi păstrate în frigider,întrucît la rece se produce precipitarea proteinelor din alcool.Se lasă la temperatura camerei şi se analizează cît mai repede posibil.

Pentru izolarea fracţiunii alcalinosolubile(gluteline) materialul vegetal se extrage de 4-5 ori cu soluţie tampon de borat 0,2 M(pH 10) conţinînd 0,2% bisulfit de sodiu.Extracţia se efectuează în acelaşi mod ca şi la separarea celorlalte fracţiuni proteice.La analiza porumbului verde şi a seminţelor unor cereale,proteinele alcalino-solubile nu se extrag complet cu tampon borat.In asemenea cazuri după tratarea materialului vegetal cu tampon borat este necesar să se realizeze o extracţie suplimentară cu soluţie de NaOH 0,2 M(de 3-4 ori).Tehnica de lucru este

aceeaşi ca şi pentru alţi dizolvanţi.

Extracţia materialului vegetal cu apă este asociată nu numai cu solubilizarea proteinelor corespunzătoare,ci şi a altor substanţe ca aminoacizi liberi,monoglucide şi oligoglucide,săruri minerale etc.De aceea extractul obţinut poate fi privit ca o soluţie uşor salină.Intr-o asemenea soluţie se pot dizolva nu numai proteinele solubile în apă(albuminele),dar şi unele proteine solubile în soluţii saline(globulinele).Ultimele se numesc globuline uşor solubile,întrucît ele trec în soluţie la concentraţii foarte mici ale sărurilor conţinute în extractul apos.Pentru separarea albuminelor de globulinele uşor solubile se efectuează dializa extractului apos faţă de apă distilată(vezi p.20).Drept antiseptic în sacul de dializă cu extractul apos se introduce un cristal de timol.Dializa se execută în camera frigorifică timp de 24 ore,schimbînd de cîteva ori apa distilată din vasul dializor. In procesul de dializă substanţele micromoleculare,inclusiv sărurile minerale,ies din sacul de celofan,în care vor rămîne numai proteinele.Deoarece la sfîrşitul dializei soluţia din sacul de celofan nu conţine săruri,proteinele salinosolubile precipită,iar în soluţie rămîn numai albuminele.Pentru separarea albuminelor de globulinele uşor solubile conţinutul sacului de celofan se transferă cu tot cu precipitat în eprubete de centrifugă,spălînd sacul de 2-3 ori cu apă distilată,care se adaugă în aceleaşi eprubete.Proteinele solubile se separă de cele insolubile prin centrifugare timp de 15 minute la 3000-4000 rot./min.Supernatantul se toarnă într-un balon cotat de 100 ml.Precipitatul proteic din eprubete se spală de 2-3 ori cu apă distilată.După centrifugare, apele de spălare se colectează în balonul cotat.Soluţia de albumine în balon se completează la semn cu apă distilată şi se introtroduce în frigider.

Precipitatul de globuline uşor solubile din eprubetele de centrifugă se dizolvă într-un volum mic de soluţie de NaCl 1M şi se trece într-un balon cotat de 25 ml.Eprubetele se spală de 2-3 ori cu volume mici de soluţie de NaCl care se adaugă în balon,se completează cu aceeaşi soluţie la semn şi se introduce în frigider.

In acest mod se obţin 5 fracţiuni proteice :albumine,globu-

line ușor solubile;care se extrag cu apă și precipită la dializă;globuline extrase cu soluție de NaCl; prolamine și gluteline. Pentru determinarea conținutului de proteine în fiecare fracțiune,se măsoară cîte 20-50 ml soluție proteică în baloane Kjeldahl și se determină cantitatea de azot prin metoda descrisă la p.200. Cantitatea fracțiunilor proteice separate în soluțiile obținute se poate determina,de asemenea,prin metoda Lowry(p.209).Totodată, în materialul cercetat se determină conținutul de azot total, proteic și neproteic,de asemenea,umiditatea făinii.

Rezultatele analizelor efectuate se înregistrează sub forma tabelului 10.4.

Tabelul 10.4

Fracțiunea	Conținutul fracțiunilor proteice	
	% din substanța uscată a materialului vegetal	% din cantitatea totală de proteine în țesut
Azot total		-
Azot neproteic		-
Azot proteic		100
Albumine		
Globuline ușor solubile		
Globuline extrase cu NaCl		
Prolamine		
Gluteline		

Observații.1.Se recomandă ca fracționarea proteinelor din plante să se efectueze în camera frigorifică la +4°C.

2.In cazul plantelor oleaginoase,semințele acestora se vor zdrobi în mojar,se vor degresa în prealabil cu eter de petrol sau acetonă timp de 18-20 ore la temperatura camerei.Materialul degresat se usucă în exsicatorul de vid sau sub nișă,se macină fin,se mai supune odată degresării și apoi se poate folosi pentru extracția fracțiunilor proteice.

10.3.DETERMINAREA ACTIVITATII UNOR ENZIME PARTICIPANTE LA METABOLISMUL PROTEINELOR SIMPLE SI AMINOACIZILOR

10.3.1.DETERMINAREA ACTIVITATII PEPTID-HIDROLAZELOR

Peptid-hidrolazele catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice în peptide şi proteine :



$$R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{H}{|}}{N}-R_1 + HOH \longrightarrow R-COOH + R_1-NH_2$$

Conform nomenclaturii actuale a enzimelor,peptid-hidrolazele se clasifică în două serii de subsubclase :

-peptidaze sau exopeptidaze(EC 3.4.11-15) şi

-proteinaze,enzime proteolitice,endopeptidaze,peptidil-peptidhidrolaze(EC 3.4.21-24).

Peptid-hidrolazele se întîlnesc în organismul tuturor reprezentanţilor lumii vii :microorganisme,plante,animale şi om.Aceste enzime îndeplinesc o serie întreagă de funcţii specifice de o deosebită importanţă,legate cu procesul de digestie,coagularea sîngelui,prevenirea formării trombelor în vasele sanguine şi liza trombelor formate,sinteza şi scindarea oligo- şi polipeptidelor biologic active,fagocitoza,de asemenea,cu metabolismul proteinelor la plante,microorganisme etc.

10.3.1.1.DETERMINAREA ACTIVITATII PROTEINAZELOR

Pentru determinarea activităţii proteinazelor s-au propus numeroase metode care pot fi clasificate în două grupe :metode în care drept substrate se folosesc proteinele şi metode cu utilizarea substratelor micromoleculare sintetice.

Intre substratele proteice cel mai adesea se numără hemoglobina,cazeina,albumina serică,ovoalbumina,edestina.De obicei se utilizează proteine denaturate,întrucît proteinazele manifestă o acţiune mai slabă asupra proteinelor cu starea nativă nemodificată.Denaturarea proteinelor-substrate în majoritatea cazurilor se realizează prin tratament termic sau cu uree.

Cea mai largă răspîndire în practica determinării proteina-

zelor au obţinut metoda Anson şi metoda Kunitz cu utilizarea hemoglobinei,respectiv a cazeinei în calitate de substrat.

DETERMINAREA ACTIVITATII PROTEINAZELOR DUPA CANTITATEA DE CAZEINA SCINDATA

Principiul metodei.Determinarea activităţii cazeinolitice a proteinazelor se face după metoda Kunitz care constă în dozarea produşilor de hidroliză eliberaţi din cazeină sub acţiunea acestor enzime.Concentraţia produşilor de hidroliză a cazeinei se poate aprecia prin măsurarea extincţiei hidrolizatului deproteinizat la 280 nm sau colorimetric cu ajutorul reactivului Folin-Ciocâlteu.

Reactivi.1.Soluţie de cazeină 2% în tampon fosfat 0,1 M cu pH-ul cerut de condiţiile experienţei.Intr-un mojar se triturează 2 g cazeină cu 10 ml soluţie de NaOH 1 N.Folosind 50 ml apă bidistilată se aduce conţinutul mojarului într-un balon cotat de 100 ml.Se corectează pH-ul soluţiei din balon la valoarea necesară cu soluţie de acid fosforic diluat(1 volum acid fosforic 85% se diluează cu 3 volume de apă bidistilată) şi se completează la semn cu apă bidistilată.

2.Soluţie de clorură de calciu 0,06 M.

3.Soluţie de acid tricloracetic 10%.

10.3.1.1.1.DETERMINAREA ACTIVITATII PROTEINAZELOR EXTRACELULARE ELIBERATE DE MICROORGANISME IN MEDIUL DE CULTURA

Modul de lucru.In două eprubete de centrifugă(probă şi martor) se măsoară cîte 1 ml soluţie de cazeină 2% în tampon fosfat cu pH 7,2 şi cîte 0,1 ml soluţie de clorură de calciu 0,06 M.In martor se adaugă 1 ml soluţie de acid tricloracetic 10%.Apoi în ambele eprubete se pipetează 0,1-0,3 ml lichid obţinut prin centrifugarea mediului de cultură pe care s-a dezvoltat microorganismul studiat.Proba se incubează timp de 60 minute în termostat la temperatura de 37°C.La sfîrşitul termostatării acţiunea hidrolizantă a proteinazelor asupra cazeinei se stopează prin adăuga-

rea 1 ml soluţie de acid tricloracetic 10%.După agitare probele se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min.In supernatantul deproteinizat şi diluat corespunzător se dozează cantitatea de tirozină.Cu acest scop 0,1-1,0 ml supernatant se amestecă cu 1,9-1,0 ml apă distilată şi se măsoară extincţia probei şi martorului la 280 nm la spectrofotometru.

Produşii hidrolizei proteolitice în probă şi martor se pot determina şi colorimetric cu reactivul Folin-Ciocâlteu.La 0,5 ml supernatant deproteinizat se adaugă 0,5 ml soluţie de sulfat de cupru 0,0025 M,4 ml soluţie de NaOH 0,5 N,şi 1,5 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat de trei ori(1:3).Peste 30 minute se citeşte extincţia martorului şi probei la un fotoelectrocolorimetru,la 760 nm,faţă de un control al rectivilor,în care supernatantul este înlocuit cu apă bidistilată.

Calculul rezultatelor.Cantitatea de tirozină scindată din molecula cazeinei sub acţiunea proteinazelor se calculează folosind curba de etalonare trasată în condiţiile testului cu o serie de soluţii etalon conţinînd 0,03-0,360 mg de tirozină.Pentru a accelera dizolvarea tirozinei în apă bidistilată se va adăuga acid tricloracetic 10%.

Activitatea proteinazelor se exprimă în micromoli de tirozină scindată de la cazeină în timp de 1 minut de enzimele corespunzătoare dintr-un ml de lichid de cultură :

$$\mu M \text{ tirozină/1 ml/1 min.} = \frac{(2,1 + V)(a_{cer} - a_m)}{v.V.60.0,1811},$$

unde : V - volumul lichidului de cultură folosit ca sursă de proteinaze,ml ;

a_{cer} - cantitatea de tirozină corespunzătoare extincţiei probei de cercetat,mg ;

a_m - cantitatea de tirozină corespunzătoare martorului, mg ;

v - volumul de supernatant luat pentru dozarea tirozinei, ml ;

0,1811 - mg corespunzătoare unui micromol de tirozină.

10.3.1.1.2. DETERMINAREA ACTIVITATII PROTEINAZELOR INTESTINALE

Modul de lucru. Obţinerea extractului enzimatic. După sacrificarea animalului de experienţă, se prelevează din tubul digestiv partea care urmează să fie analizată şi se curăţă cu atenţie de ţesutul adipos. O cantitate de 0,5 g intestin se mojarează cu sticlă pisată pînă la obţinerea unei mase omogene(3-5 minute). Se adaugă 2 ml apă distilată cu temperatura de +4°C şi se continuă mojararea încă 2-4 minute. Se pipetează încă 3 ml de apă distilată în mojar, se amestecă bine şi se trece conţinutul într-o eprubetă de centrifugă. Se centrifughează 15 minute la 3000 rot./min., la o centrifugă cu răcire. Supernatantul separat se va folosi ca sursă de enzime proteolitice.

Determinarea activităţii proteinazelor. Se măsoară în două eprubete de centrifugă cîte 1 ml de cazeină 2% în tampon fosfat cu pH 7,6. Una din eprubete va constitui proba de cercetat, iar cealaltă martorul. In martor se adaugă 1 ml de acid tricloracetic 10%, apoi în ambele eprubete se pipetează 0,1-0,5 ml extract enzimatic, în funcţie de presupusa activitate proteolitică. Proba de cercetat se incubează la 37°C timp de 15 minute, după care reacţia de hidroliză a cazeinei sub acţiunea proteinazelor se întrerupe prin adăugarea 1 ml soluţie de acid tricloracetic 10%. Precipitatul de substrat nescindat şi de protein-enzime se separă prin centrifugare timp de 15 minute la 3000 rot./min.

In supernatantul clar se dozează concentraţia produşilor de scindare enzimatică a cazeinei pe calea descrisă la determinarea activităţii proteinazelor microorganismelor.

Calculul rezultatelor. Pe curba de etalonare construită cu tirozină în modul descris mai sus, se află numărul de mg de aminoacid corespunzător extincţiei probei şi martorului.

Activitatea proteinazelor intestinale se exprimă în micromoli de tirozină scindată de enzimele dintr-un g de intestin în timp de 1 minut, la 37°C.

$$\mu M \text{ tirozină/1 g/1 min.} = \frac{(a_{cer} - a_m)(2 + v).V}{n.v.p.0,1811},$$

unde : a_{cer} - mg tirozină în proba de cercetat ;

a_m - mg tirozină în martor ;

n - volumul(ml) supernatant în care s-a dozat tirozina ;

v - volumul de extract enzimatic luat pentru incubare,în ml ;

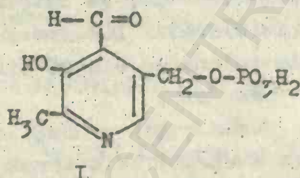
V -volumul total al omogenatului tisular,în ml ;

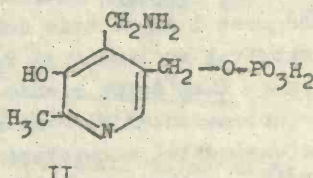
p - greutatea ţesutului intestinal mojarat,în g.

Adesea se obişnuieşte să se raporteze activitatea proteinazelor la 1 mg de protein-enzimă,adică se calculează activitatea lor specifică.Proteina în extractul enzimatic se determină prin metoda Lowry(în mg/ml).In acest caz activitatea proteinazelor, calculată în micromoli tirozină/ml extract enzimatic se împarte la numărul mg de proteină într-un ml extract.

10.3.2.DETERMINAREA ACTIVITATII AMINOTRANSFERAZELOR

Aminotransferazele(transaminazele) catalizează în organismul viu procesul de transaminare,adică reacţia de transfer reversibil a grupării aminice între aminoacizi şi cetoacizi.Aminotransferazele sînt enzime bicomponente care au drept coenzimă piridoxal-5'-fosfatul(I) şi piridoxamin -5'-fosfatul(II).

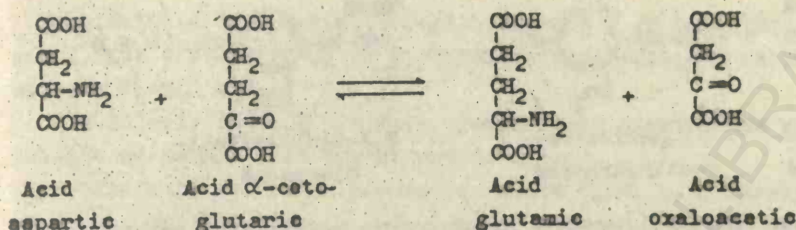




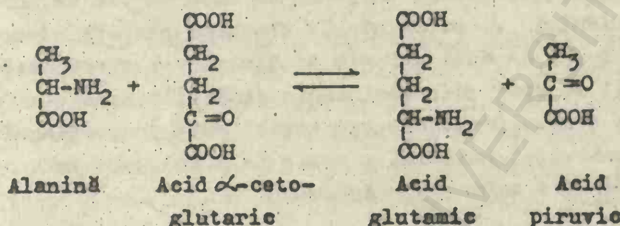
Denumirea diferitelor aminotransferaze derivă de la numele aminoacidului care cedează gruparea amino şi numele cetoacidului acceptor al acestei grupări.

Intre aminotransferazele cunoscute un interes deosebit prezintă aspartat-aminotransferaza(AspT) sau glutamico-oxaloacetat-aminotransferaza(GOT),cu codul EC 2.6.1.1. şi alanin-aminotransferaza(AlaT) sau glutamico-piruvat-aminotransferaza(GPT),avînd codul EC 2.6.1.2.

Aspartat-aminotransferaza catalizează reacţia :



Alanin-aminotransferaza catalizează reacţia :

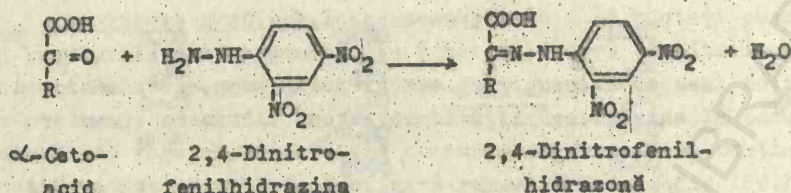


Aceste două aminotransferaze posedă o activitate catalitică pronunţată şi sînt larg răspîndite în diferite organe animale : ficat,miocard,muşchi scheletici,rinichi etc.In serul sanguin,de asemenea,în ţesuturile vegetale activitatea celor două aminotransferaze este mai scăzută.

Există mai multe metode de determinare a activităţii aminotransferazelor.Foarte comodă şi accesibilă este metoda colorimetrică cu 2,4-dinitrofenilhidrazină.

DETERMINAREA ACTIVITATII ASPARTAT- SI ALANIN-AMINOTRANSFERAZELOR IN SERUL SANGUIN

Principiul metodei.In urma transaminării realizate sub acţiunea AspT şi AlaT se formează acizii oxaloacetic şi piruvic. Acidul oxaloacetic poate să se decarboxileze în cursul reacţiei enzimatice în acid piruvic.Prin adăugarea soluţiei acide de 2,4-dinitrofenilhidrazină la sistemul de reacţie se întrerupe procesul enzimatic şi se formează dinitrofenilhidrazonele acizilor α-cetoglutaric,oxaloacetic şi piruvic,colorate în mediul alcalin :



Pentru a nu interfera în măsurarea activităţii aminotransferazelor, acidul α-cetoglutaric se adaugă în cantitate mică, iar extincţia probelor se citeşte la lungimea de undă de 546 nm, unde fenilhidrazona acidului α-cetoglutaric absoarbe slab. Pe măsura creşterii conţinutului de acid piruvic şi diminuării corespunzătoare a cantităţii de acid α-cetoglutaric extincţia amestecului de fenilhidrazone creşte. Creşterea extincţiei este proporţională cu sporirea concentraţiei acidului piruvic în probă, care este dependentă de activitatea aminotransferazelor.

Reactivi. 1. Soluţie tampon de fosfaţi 0,1 M cu pH 7,4. Se dizolvă 1,5045 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ şi 0,1288 g KH_2PO_4 în 50 ml apă bidistilată la balon cotat.

2. Soluţie de NaOH 1N. Se dizolvă 11 g NaOH în 250 ml apă distilată. Se stabileşte factorul soluţiei de hidroxid de sodiu cu ajutorul acidului oxalic şi se face corecţia necesară pentru a obţine o soluţie de NaOH exact 1 N.

3. Soluţie substrat pentru AspT. Intr-un pahar mic peste 7,5mg de acid α-cetoglutaric şi 665 mg de acid DL-aspartic(333 mg acid L-aspartic) se adaugă soluţie de NaOH 1N pînă la dizolvarea completă a celor două substrate, apoi 10 ml soluţie tampon de fosfaţi 0,1 M şi se corectează pH-ul la 7,4 , utilizînd un pH-metru. Soluţia se transvazează într-un balon cotat de 25 ml, se spală paharul cu soluţie tampon de fosfaţi 0,1 M(pH 7,4) şi se completează conţinutul la semn tot cu soluţie tampon. Soluţia de substrat se agită, se adaugă o picătură de cloroform şi se păstrează în frigider.

4. Soluţie substrat pentru AlaT. Se introduc într-un pahar mic 7,5mg de acid α-cetoglutaric şi 445 mg de DL-alanină(223 mg de L-alanină). Mai departe se procedează după indicaţiile date la prepararea primei soluţii de substrat(reactiv 3).

5.Soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 mM în soluţie de HCl 1 N.Se dizolvă 20 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazină în 100 ml soluţie de HCl 1 N.

6.Soluţie de NaOH 0,4 N.Se prepară prin amestecarea a 200ml soluţie de NaOH 1 N cu 300 ml apă distilată.

7.Soluţie etalon de piruvat de sodiu 0,001 M.Se dizolvă 11 mg de piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată la balon cotat.Un ml soluţie etalon conţine 110 micrograme piruvat de sodiu,ceea ce corespunde la 88 micrograme sau 100 micromoli de acid piruvic.

Tehnica determinării activităţii aspartat-aminotransferazei.In două eprubete se măsoară cîte 0,5 ml soluţie de substrat pentru AspT şi se incubează la 37°C timp de 5 minute.Apoi,în prima eprubetă(proba) se adaugă 0,1 ml ser sanguin nehemolizat şi se continuă incubaţia 60 minute.La sfîrşitul acestui interval de timp eprubetele se scot din termostat şi imediat se adaugă în fiecare din ele cîte 0,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină. In eprubeta 2(martor) se pipetează 0,1 ml ser.Se agită şi se lasă timp de 20 minute la temperatura camerei.După aceasta se introduce în fiecare eprubetă cîte 5 ml soluţie de NaOH 0,4 N,se agită cu atenţie şi se lasă la temperatura camerei timp de 10 minute pentru dezvoltarea culorii.Extincţia probei şi martorului se citeşte la un fotoelectrocolorimetru,utilizînd filtrul verde(546 nm) şi apa ca lichid de compensaţie.

Tehnica determinării activităţii alanin-aminotransferazei. In două eprubete se pipetează cîte 0,5 ml soluţie substrat pentru AlaT şi se incubează la 37°C timp de 5 minute.Apoi în una din eprubete se măsoară 0,1 ml ser(proba) şi se introduce iarăşi în termostat pentru 30 minute.

Mai departe se procedează în mod identic ca la determinarea activităţii AspT.

Calculul rezultatelor.Diferenţa între extincţia probei şi extincţia martorului indică o schimbare a intensităţii lichidelor din eprubete în urma desfăşurării reacţiilor catalizate de aminotransferazele respective.

Activitatea AspT şi AlaT se poate exprima în unităţi convenţionale de extincţie,care se calculează după formula :

$$(E_{probă} - E_{martor}) \times 100.$$

Insă mai corect este ca activitatea aminotransferazelor să se exprime în miliunităţi enzimatice(mU) într-un ml de ser(1 mU corespunde unei activităţi a enzimei care în condiţiile experimentale date catalizează formarea unui micromol de acid piruvic într-un minut), conform recomandărilor I.U.B.(Uniunea Internaţională de Biochimie).

In acest caz calculul activităţii aminotransferazelor se efectuează folosind curba de etalonare construită cu ajutorul soluţiei etalon de piruvat de sodiu. La construirea curbei etalon se poate utiliza schema redată în tabelul 10.5.

Tabelul 10.5.

Schema pentru construirea curbei etalon la determinarea activităţii aminotransferazelor/

Reactivi		Proba 1	2	3	4	5	6	7
Conţinutul de acid piruvic în probă	γ	4,4	8,8	13,2	17,7	22,0	26,4	0
	μM	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0
Soluţie etalon de piruvat de Na(ml)		0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0
Apă distilată(ml)		0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,6

In eprubete separate se măsoară ingredienţii menţionaţi în tabelul 10.5., se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină şi se agită. Exact după 20 minute de repaus, în fiecare eprubetă se pipetează 5 ml soluţie de NaOH 0,4 N, se amestecă şi se lasă la temperatura camerei timp de 10 minute. Se citesc extincţiile probelor la 546 nm faţă de proba 7.

La trasarea curbei etalon se înscrie pe abscisă concentraţia acidului piruvic în micromoli, iar pe ordonată extincţiile corespunzătoare.

Calculul final se face cu ajutorul formulei :

$$\frac{mU}{1\ ml\ ser \times 1\ min.} = \frac{a}{0,1.t},$$

unde : a - numărul micromolilor de acid piruvic,găsit pe curba etalon ;

t - timpul de incubaţie,în minute.

Observaţii.1.Serul trebuie să fie proaspăt şi nehemolizat.

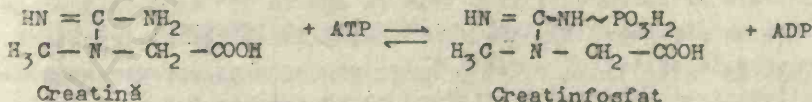
2.Dacă serul posedă o activitate aminotransferazică mare, acesta se diluează cu soluţie de albumină 5% în ser fiziologic.Rezultatele obţinute se vor înmulţi cu coeficientul de diluare corespunzător.

Valori fiziologice.In serul sanguin al oamenilor sănătoşi activitatea AspT oscilează între 2-16 mU/ml,iar activitatea AlaT-între limitele 2-12 mU/ml.

Nivelul normal al aminotransferazelor serice este,în general, constant.Variaţii mari ale activităţii aminotransferazelor sanguine se observă în bolile ficatului,în infarctul miocardic etc.Determinarea activităţii aminotransferazelor în serul sanguin constituie un indicator fin al acuităţii proceselor patologice în ficat şi de aceea are o mare importanţă pentru diagnosticarea diferenţiată a bolilor respective.Nu mai puţină însemnătate are determinarea activităţii transaminazelor în stabilirea diagnosticului bolilor de inimă.

10.3.3.DETERMINAREA ACTIVITATII CREATINKINAZEI

Creatinkinaza(ATP : creatin-N-fosfotransferaza,EC 2.7.3.2) catalizează transferul restului de fosfat de la ATP la creatină,cu formarea creatinfosfatului şi ADP,conform reacţiei :



Creatină Creatinfosfat

Reacţia catalizată de creatinkinază este reversibilă şi prezintă o mare importanţă pentru metabolismul substanţelor în muşchi, întrucît permite acumularea energiei chimice a ATP în creatinfosfat,compus macroergic cu rol deosebit în fenomenele biochimice

ale contracţiei musculare. La pH alcalin(pH 9) echilibrul sistemului este deplasat în direcţia formării ATP. Activitatea creatinkinazei este stimulată de ionii de Mg^{+2}.

Creatinkinaza se găseşte în cantitate mare în ţesutul muscular. Serul sanguin provenit de la oameni sănătoşi conţine urme de creatinkinază.

Activitatea creatinkinazei poate fi determinată prin metode care îşi propun dozarea creatinfosfatului, ADP sau creatinei.

Determinarea activităţii creatinkinazei în serul sanguin.

Principiul metodei. Prin adăugarea serului sanguin în mediul de incubaţie, conţinînd creatinfosfat şi ADP, se formează creatina. Ultima se dozează după reacţia de culoare cu α-naftolul şi diacetilul. Activitatea creatinkinazei se estimează în funcţie de cantitatea de creatină formată.

Reactivi. 1. Soluţie tampon trihidroximetilaminometan(Tris) 0,1 M cu pH 7,2.

2. Soluţie de creatinfosfat 0,006 M.

3. Soluţie de acid adenozindifosforic(ADP) 0,06%.

4. Soluţie de hidroxid de bariu 5%.

5. Soluţie de sulfat de zinc 5%.

6. Soluţie de α-naftol 1%. Se dizolvă 100 mg de α-naftol în 10 ml soluţie alcalină conţinînd 16% Na_2CO_3 şi 6% hidroxid de sodiu.

7. Soluţie de diacetil 0,4%.

Modul de lucru. Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,25 ml soluţie tampon Tris, 0,25 ml apă distilată, 0,1 ml soluţie de creatinfosfat şi 0,1 ml ser sanguin. In eprubeta pentru martor se adaugă apă distilată în locul serului, deci 0,35 ml apă distilată. Eprubetele se introduc într-o baie de apă la 37° timp de 5 minute, apoi se pipetează cîte 0,2 ml soluţie de ADP şi se incubează 30 minute. La sfîrşitul perioadei de incubaţie se opreşte acţiunea creatinkinazei, adăugînd în fiecare eprubetă cîte 0,2 ml soluţie de hidroxid de bariu şi 0,2 ml soluţie de sulfat de zinc. Peste 15-20 minute eprubetele se centrifughează la 3000 rot./min., timp de 15 minute. Se amestecă 1 ml supernatant cu 1 ml soluţie proaspăt preparată de α-naftol şi 0,25 ml soluţie preparată extempo-

raneu de diacetil.Ordinea de adăugare a reactivilor trebuie respectată obligatoriu.Eprubetele se lasă la întuneric timp de 20 minute pentru dezvoltarea culorii.Se colorimetrază la 536 nm.

Calculul rezultatelor. Activitatea creatinkinazei este proporţională cu diferenţa între extincţiile probei şi martorului.Se citesc extincţiile respective pe curba de etalonare,construită cu creatină.Ca unitate de activitate a creatinkinazei se consideră activitatea enzimatică a 0,1 ml ser sanguin care conduce la formarea unui micromol de creatină într-un minut şi la $37^{o}C$.Atunci rezultatul final se efectuează după formula :

$$\frac{\text{micromoli creatină}}{\text{1 ml x 1 min.}} = \frac{a_p - a_m}{0{,}1.30.131} ,$$

unde : a_p - numărul microgramelor de creatină corespunzător extincţiei probei ;

a_m - numărul microgramelor de creatină corespunzător extincţiei martorului ;

131- cantitatea de micrograme ce revin unui micromol de creatină.

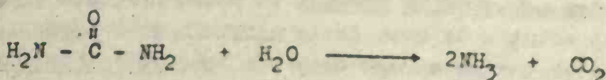
Interpretarea rezultatelor. In condiţii normale în serul sanguin se evidenţiază o activitate creatinkinazică foarte scăzută.

Activitatea creatinkinazei poate creşte în serul sanguin după un efort muscular chiar şi la subiecţii normali.

O creştere însemnată a activităţii creatinkinazei în serul sanguin se observă în afecţiunile muşchilor scheletici(miopatii, miozite) şi în infarctul miocardic.

10.3.4.DETERMINAREA ACTIVITATII UREAZEI

Ureaza(uree-amidohidrolaza,EC 3.5.1.5) catalizează descompunerea ureei în dioxid de carbon şi amoniac:



$$H_2N - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - NH_2 + H_2O \longrightarrow 2NH_3 + CO_2$$

Această enzimă se întîlneşte în ciuperci, plantele superioare, ţesuturile animalelor inferioare şi mucoasa stomacală a diferitelor mamifere.

Activitatea ureazei poate fi apreciată prin dozarea unuia din produşii care rezultă în urma hidrolizei enzimatice a ureei, sau a cantităţii de substrat nescindat.

Determinarea activităţii ureazei în plante

Principiul metodei. Determinarea activităţii ureazei se bazează pe estimarea cantităţii de uree, rămasă nehidrolizată după inhibarea enzimei. Diferenţa între cantitatea de uree introdusă în probă şi cantitatea de uree dozată la sfîrşitul reacţiei reflectă activitatea ureazei.

Reactivi. 1. Eter etilic sau eter de petrol.

2. Toluen.

3. Soluţie de uree 2% în tampon de fosfaţi M/10 cu pH 7,0 (Soluţia tampon de fosfaţi M/10 cu pH 7,0 se obţine prin dizolvarea a 4,37 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ şi 1,2172 g de $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ în 200 ml apă distilată la balon cotat).

4. Soluţie de acid tricloracetic 10%.

5. Soluţie de para-dimetetilaminobenzaldehidă 2%. Se dizolvă 2 g de p-dimetilaminobenzaldehidă în 90 ml alcool etilic 95% şi se amestecă cu 10 ml HCl concentrat.

6. Soluţie etalon de uree 0,04 g%. Un ml din soluţia etalon conţine 0,4 mg uree.

Modul de lucru. Extracţia ureazei. Pentru obţinerea extractului ureazic se amestecă 2 g de făină proaspătă de soia (sau făină de alte leguminoase) cu 20 ml de apă distilată. Se adaugă 5-10 picături de toluen şi se lasă la +4°C timp de 15-20 ore. In acest interval de timp cea mai mare parte din urează trece din făină în soluţie. Amestecul se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot/min. Supernatantul separat se foloseşte drept sursă de urează.

Determinarea activităţii ureazei. In patru eprubete se pipetează cîte 4 ml soluţie de uree 2%. In ultimele două eprubete, care vor servi drept martor, se adaugă cîte 5 ml soluţie de acid tricloracetic 10%. Apoi în toate cele patru eprubete se introduce

cîte un ml extract de urează şi se agită conţinutul lor.Eprubetele 1 şi 2(probe) se incubează timp de 30 minute la 37°C.După incubare ureaza în probe se inhibă prin adăugarea a 5 ml soluţie de acid tricloracetic.Se agită şi se filtrează conţinutul celor patru eprubete pe hîrtie de filtru cantitativă.

În filtratul limpede se determină conţinutul de uree prin reacţia de culoare cu p-dimetilaminobenzaldehidă.În eprubete separate se măsoară cîte 0,5 ml filtrat din probe şi martor,se adaugă 1,5 ml apă distilată şi 1 ml soluţie de p-dimetilaminobenzaldehidă.Se agită conţinutul şi eprubetele se termostatează timp de 10 minute la 25°C pentru dezvoltarea culorii.Extincţiile probelor şi martorilor se citesc la spectrofotometru la 420 nm sau la un fotoelectrocolorimetru cu filtru albastru,faţă de controlul reactivilor(2 ml apă şi 1 ml p-dimetilaminobenzaldehidă).

Calculul rezultatelor.Cantitatea de uree în probe şi martori se află pe curba etalon.Pentru alcătuirea curbei etalon în eprubete uscate se pipetează 0;0,2;0,3;0,4;0,5;0,8;1,0;1,2 şi 1,5 ml soluţie etalon de uree,se completează volumul la 2 ml cu apă distilată şi se efectuează reacţia de culoare cu p-dimetilaminobenzaldehidă în modul descris mai sus.

La efectuarea calculului din media cantităţilor de uree găsite în martori se scade media cantităţilor de uree rămase în probe.Diferenţa obţinută reprezintă partea de uree hidrolizată sub acţiunea ureazei.

Ca unitate de urează se consideră cantitatea de enzimă care în condiţiile menţionate hidrolizează 1 mg de uree într-un minut.

Activitatea ureazei se exprimă în unităţi ureazice la 1 g de seminţe(făină) în unitatea de timp :

$$U = \frac{(a_m - a_p).10.20}{0,5.2.30} ,$$

unde : U - numărul unităţilor de urează/1 g/1 min. ;

a_m-media cantităţilor de uree corespunzătoare extincţiilor martorilor,în mg ;

a_p-media valorilor de uree corespunzătoare extincţiilor probelor,în mg.

10.4.DETERMINAREA UNOR PRODUSI FINALI AI METABOLISMULUI AMINOACIDIC SI PROTEIC

10.4.1.DOZAREA UREEI

Ureea constituie produsul final principal al metabolismului aminoacizilor în organismul omului,mamiferelor,peştilor maritimi cartilaginoşi şi amfibienilor.Ureea se sintetizează la nivelul ficatului,de unde este vehiculată de sînge spre rinichi,fiind astfel eliminată din organismul animal în urină.

Dozarea ureei în lichidele biologice se poate efectua cu ajutorul metodelor gazometrice,colorimetrice,enzimatice etc.

Cea mai mare răspîndire au metodele colorimetrice bazate pe reacţia ureei cu diacetilmonoxima.De o largă răspîndire se bucură şi metoda cu p-dimetilaminobenzaldehidă.

10.4.1.1.DOZAREA UREEI PRIN METODA CU DIACETILMONOXIMA

Principiul metodei.Ureea reacţionează cu diacetilmonoxima în mediu acid,formînd un compus colorat în galben care se dozează pe cale fotometrică.

Reactivi.1.Soluţie de sulfat de cadmiu.Se dizolvă 1,33 g sulfat de cadmiu în 6,35 ml soluţie de acid sulfuric 1 N şi se completează cu apă distilată la 100 ml.

2.Soluţie tampon borat cu pH 12.Se dizolvă 6,2 g acid boric în 150 ml soluţie de NaOH 1 N şi se completează cu apă la 1000 ml.

3.Soluţie de diacetilmonoximă 0,5% în acid acetic 5%.

4.Soluţie de antipirină(4-aminofenazonă) 0,4% în acid sulfuric 40%.

5.Soluţie etalon de uree.Se dizolvă 50 mg uree în 100 ml soluţie de acid benzoic 0,2%.Un ml soluţie etalon conţine 0,5 mg uree.

Tehnica dozării ureei în serul sanguin.La 4 ml soluţie de sulfat de cadmiu într-o eprubetă de centrifugă se adaugă 0,1 ml sînge oxalatat sau 0,1 ml ser şi după cîteva minute 5,9 ml soluţie tampon de borat.Amestecul se agită şi se lasă 5-10 minute în repaus,cel mai bine la rece.Se centrifughează la 3000 rot./min.

Proteinele serice pot fi precipitate şi cu soluţie de acid tricloracetic.Intr-o eprubetă de centrifugă se amestecă 0,9 ml apă distilată,0,1 ml ser sanguin şi 1 ml de soluţie de acid tricloracetic 10%.După 15-20 minute,conţinutul eprubetei se centrifughează.

Intr-o eprubetă se pipetează 1 ml supernatant şi 4 ml apă distilată sau 0,2 ml supernatant şi 4,8 ml apă distilată dacă deproteinizarea s-a făcut cu acid tricloracetic.Se măsoară 1 ml soluţie de diacetilmonoximă şi 4 ml soluţie de antipirină.Se amestecă conţinutul eprubetei şi aceasta se introduce pentru 50 minute într-o baie de apă la fierbere.Eprubeta se închide cu un dop de sticlă pentru a evita evaporarea lichidului.

Paralel cu proba de cercetat se realizează o probă etalon şi un control pentru reactivi.In cazul probei etalon se amestecă 0,1 ml soluţie etalon cu reactivii folosiţi la precipitarea proteinelor serice şi din amestec se ia 1(0,2) ml pentru reacţia de culoare.Controlul reactivilor se efectuează luînd în locul supernatantului apă distilată.

Eprubetele se scot din baia de apă şi se răcesc cu apă de robinet.Se determină extincţia probei de cercetat şi a probei etalon la 460 nm faţă de proba în alb(controlul reactivilor).

Calculul rezultatelor se execută după formula :

$$\text{mg uree/100 ml ser(sînge)} = \frac{E_{cer}}{E_{et}} \cdot 50 \quad ,$$

unde : E_{cer} - extincţia probei de cercetat ;
E_{et} - extincţia probei etalon ;
50 - concentraţia ureei(mg%) în soluţia etalon.

Tehnica dozării ureei în urină.Inainte de analiză urina filtrată(luată din urina din 24 de ore) se diluează cu ser fiziologic în raportul 1:25 sau 1:50.Determinarea ureei se înfăptuieşte după procedeul descris pentru serul sanguin,cu diferenţa că în locul acestuia se iau 0,1 ml urină diluată.

Paralel se realizează proba etalon şi controlul reactivilor ca şi pentru dozarea ureei în serul sanguin.

Calculul cantităţii de uree în urină din 24 de ore se face

conform formulei :

$$X = \frac{E_{cer} \cdot 0,005 \cdot V \cdot d \cdot 10}{E_{et} \cdot 0,1 \cdot 1000},$$

unde : X - cantitatea de uree(g) în urina din 24 de ore ;

E_{cer} - extincţia probei cu urină ;

E_{et} - extincţia probei etalon ;

0,005- cantitatea de uree(mg) în proba etalon ;

V - volumul urinii(ml) din 24 de ore ;

d - gradul de diluare(25 sau 50) ;

1000-coeficient de transformare a valorilor conţinutului de uree din mg în g.

Observaţii.1.Datorită instabilităţii complexului colorat format de uree cu diacetilmonoxima,măsurarea extincţiei trebuie să se facă în primele 15 minute după răcirea probelor.

2.Dacă la determinarea ureei în urină extincţiile obţinute depăşesc valorile 0,13-0,15,se va mări gradul de diluare a urinii.

3.Sensibilitatea mare a metodei reclamă sticlărie perfect curată;simpla atingere cu mîna a gurii eprubetei şi a vîrfului pipetei poate duce la valori eronate datorită urmelor de uree de pe piele.

10.4.1.2.DOZAREA UREEI PRIN METODA CU PARA-DIMETILAMINOBENZALDEHIDA

Această metodă este deosebit de simplă,puţin laborioasă şi în privinţa specificităţii şi exactităţii nu este departe de alte metode.

Principiul metodei.Prin interacţiunea ureei cu para-dimetilaminobenzaldehida în mediu acid rezultă un produs colorat în galben,care se determină colorimetric.

Reactivi.1.Soluţie de acid tricloracetic 10%.

2.Soluţie de para-dimetilaminobenzaldehidă 4% în alcool etilic absolut sau 96%.

3.Soluţie de HCl 1 N.

4.Amestec de soluţie de para-dimetilaminobenzaldehidă(reac-

tiv 2) cu soluţie de HCl 1 N(reactiv 3) în raportul 1:4.Acest amestec se prepară cu 2-3 ore înainte de începerea determinării.

4.Soluţie etalon de uree 30 mg%.Se conservă sub un strat de toluen.

Tehnica determinării ureei în serul sanguin.Intr-o eprubetă de centrifugă se amestecă 1 ml ser sanguin sau plasmă cu 1 ml soluţie de acid tricloracetic 10%.Se lasă în repaus 10 minute.Se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min.

Intr-o eprubetă curată se transferă 1,5 ml supernatant şi se adaugă 2,5 ml reactiv 4.Se agită şi după 10 minute se măsoară extincţia probei faţă de apă bidistilată la un fotoelectrocolorimetru,utilizînd filtrul albastru(produsul colorat are maximum de absorbţie la 430 nm şi minimum la 475 nm).

Paralel cu proba de cercetat se execută proba etalon,amestecînd 1 ml soluţie etalon de uree cu 1 ml soluţie de acid tricloracetic.Din amestecul obţinut se pipetează 1,5 ml şi se efectuează reacţia de culoare ca la proba cu ser.

Calculul rezultatelor.Conţinutul ureei sanguine se calculează după formula :

$$\text{mg uree/100 ml ser(sînge)} = \frac{E_{cer}}{E_{et}} \cdot 30 \quad ,$$

unde : E_{cer}-extincţia probei de cercetat ;
E_{et} -extincţia probei etalon.

Tehnica determinării ureei în urină.Urina de analizat se diluează cu apă distilată în raportul de 1:50 sau 1:100.Se introduce 1 ml urină într-un balon cotat de 100 ml,se completează la semn cu apă distilată şi se agită.

Conţinutul ureei în urina diluată se determină după tehnica pentru ser.In locul soluţiei de acid tricloracetic se adaugă apă distilată;nu se centrifughează.

Calculul rezultatelor.Numărul gramelor de uree(X) în urina din 24 de ore se află cu ajutorul formulei :

$$X = \frac{E_{cer}.V.0,225.2.d}{E_{et}.1,5.1000},$$

unde : E_{cer} - extincţia probei de cercetat ;
E_{et} - extincţia probei etalon ;
V - volumul(ml) urinii din 24 de ore ;
d - gradul de diluare(50 sau 100) ;
0,225- mg de uree în proba etalon ;
1000 - coeficient de transformare în g.

Valori fiziologice. Concentraţia ureei în serul sanguin normal este cuprinsă între 20 şi 40 mg%.

In mod normal în volumul de urină din 24 de ore se elimină 20-35 g uree.

Variaţii fiziopatologice. La interpretarea rezultatelor analizei trebuie ţinut seama de faptul că alimentaţia bogată în proteine poate să determine creşterea concentraţiei ureei în sînge pînă la 50 mg%,iar dieta alimentară cu un conţinut scăzut de proteine provoacă diminuarea nivelului ureei pînă la 12 mg%.

Intre alte stări fiziologice însoţite de scăderea valorii ureei în sînge se numără graviditatea.

In clinică determinarea cantitativă a ureei a dobîndit o însemnătate deosebită pentru diagnosticul bolilor de rinichi.

Valori crescute ale ureei sanguine se întîlnesc în insuficienţa renală,anuriile extrarenale,boala Addison,catabolismul intens al proteinelor,boli infecţioase acute,lipsa ionului de clor din organism,deshidratări etc.

Cantităţi scăzute de uree în sînge se constată în cazul lezării profunde a parenchimului hepatic,în insuficienţa hepatică acută,ciroză decompensată etc.

Creşterea conţinutului de uree în urină este caracteristică pentru anemia canceroasă,febră,dieta hiperproteică,intoxicaţii cu fosfor;scăderea cantităţii de uree în urină se observă în nefrite, acidoze,insuficienţa hepatică acută,ciroză etc.

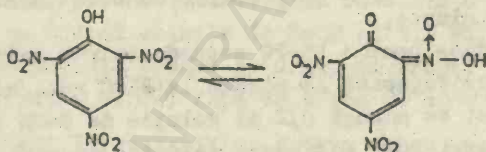
10.4.2. DETERMINAREA CANTITATIVA A CREATININEI

Creatinina este un alt produs final al metabolismului aminoacizilor, deoarece ea provine din creatină, care se sintetizează din glicocol, arginină şi metionină. Creatina (acidul metilguanidinacetic) se găseşte în cantitate însemnată în muşchi, unde serveşte drept precursor pentru sinteza creatinfosfatului, compus macroergic cu rol deosebit în fenomenele chimice ale contracţiei musculare. Creatinfosfatul, după ce participă la chimismul contracţiei musculare, pierde acidul fosforic şi se transformă în creatinină :



Creatinina astfel formată se elimină din organismul animal prin urină.

Principiul metodei. Creatinina reacţionează cu forma enolică a acidului picric dînd picratul de creatinină care în mediu alcalin se transformă în forma tautomeră de culoare roşie (reacţia Jaffé) :



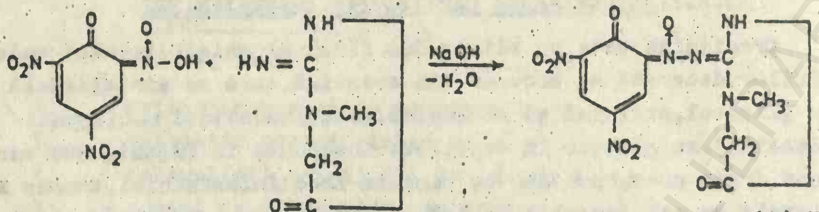
Acid picric   Forma enolică a acidului picric

Intensitatea coloraţiei produsului format este proporţională cu concentraţia creatininei în proba de cercetat.

Reactivi. 1. Soluţie saturată de acid picric. Se dizolvă 1,2 g de acid picric în 100 ml apă distilată prin încălzire pe baia de apă. Se lasă în repaus timp de 24 de ore la temperatura camerei şi se filtrează.

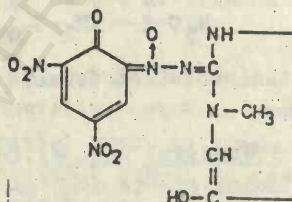
2. Soluţie de hidroxid de sodiu 10%.

3. Soluţie de acid clorhidric 0,1 N.



Picrat de creatinină





Forma tautomeră a picratului de creatinină

4.Soluţie stoc de creatinină 113 mg% în soluţie de acid clorhidric 0,1 N.

5.Soluţie standard de creatinină 1,13 mg%.Se diluează 1 ml soluţie stoc de creatinină la 100 ml cu soluţie de HCl 1 N.

<u>Tehnica determinării creatininei în serul sanguin</u>.Intr-o eprubetă de centrifugă se amestecă 1 ml de ser sanguin cu 3 ml soluţie saturată de acid picric.Se lasă în repaus timp de 5 minute, apoi eprubeta se introduce pentru 15-20 secunde într-o baie de apă la fierbere.Se centrifughează 15 minute la 3000 rot./min.

La 2 ml supernatant se adaugă 0,2 ml soluţie de NaOH 10% şi se agită cu atenţie.Uneori după adăugarea soluţiei de hidroxid de sodiu poate să apară o uşoară opalescenţă din cauza precipitării urmelor de fosfaţi.In acest caz supernatantul alcalinizat se centrifughează din nou.

Paralel cu proba de cercetat se efectuează proba standard şi o probă de control pentru reactivi.

Proba standard se execută astfel : se amestecă 0,1 ml soluţie standard de creatinină cu 1,5 ml soluţie saturată de acid picric, 0,2 ml soluţie de NaOH 10% şi 0,4 ml de apă distilată.

Proba de control se prepară din 1,5 ml soluţie saturată de acid picric,0,2 ml soluţie de NaOH şi 0,5 ml de apă distilată.

După 10 minute de la adăugarea soluţiei de hidroxid de sodiu,

extincţiile probelor de cercetat şi standard se determină la 520 nm(filtru verde),faţă de proba de control.

Calculul rezultatelor se face cu formula :

$$\text{mg creatinină/100 ml ser} = \frac{E_{probă}}{E_{standard}} \times 1,13 \ ,$$

unde : $E_{probă}$ -extincţia probei cu ser ;
$E_{standard}$ - extincţia probei standard.

Tehnica dozării creatininei în urină.Se colectează urina pe 24 ore,amestecîndu-se şi măsurîndu-se volumul.Din această cantitate se ia 0,25 ml şi se diluează cu apă distilată la 25 ml.Se pipetează 1 ml urină diluată într-o eprubetă,se adaugă 1,5 ml soluţie saturată de acid picric şi 0,2 ml soluţie de hidroxid de sodiu.Se agită şi se lasă în repaus 10 minute,timp în care creatinina se transformă în picrat.Se completează volumul probei la 5 ml cu apă distilată(2,3 ml).

Paralel cu proba de cercetat se prepară o probă standard în care urina diluată se înlocuieşte cu 1 ml soluţie standard de creatinină.

Proba de control se obţine amestecînd 1,5 ml soluţie de acid picric cu 0,2 ml soluţie de NaOH şi 3,3 ml apă distilată.

Extincţiile probei cu urină şi probei standard se măsoară la 520 nm(filtru verde) faţă de proba de control.

Calculul rezultatelor.Pentru calcul se va folosi următorrea formulă :

$$\text{g creatinină/24 ore} = \frac{E_{cer}.0,0113.25.V}{E_{st}.0,25.1000} \ ,$$

unde : E_{cer} - extincţia probei cu urină ;
E_{st} - extincţia probei standard ;
V - volumul urinei pe 24 ore.

Observaţii.1.Măsurarea extincţiilor probelor trebuie făcută în primele 20 minute de la adăugarea soluţiei de hidroxid de sodiu.

2. In calitate de conservant pentru urină se poate folosi timolul şi toluenul, care nu importunează determinarea creatininei.

Valori normale. Conţinutul de creatinină în serul sanguin oscilează între 0,4 şi 1,3 mg/100 ml. Urina din 24 de ore conţine 0,5-2g de creatinină.

Variaţii fiziopatologice. Creşterea cantităţii de creatinină sanguină şi în urină se observă după un consum excesiv de alimente bogate în proteine şi efortul muscular susţinut, în insuficienţa renală, distrofia musculară progresivă etc.

Bibliografie : 4,7,17,18,20,23,29,32,36,41,44,45,46,47,49

11. PROTEINELE COMPLEXE SI METABOLISMUL LOR

Proteinele compexe sau conjugate,numite,de asemenea,heteroproteine,sînt alcătuite din proteine simple şi o grupare prostetică neproteică.Intre heteroproteine au o însemnătate biologică deosebită nucleoproteinele şi cromoproteinele.

11.1. CERCETAREA NUCLEOPROTEINELOR

Nucleoproteinele reprezintă complecşi ai proteinelor simple cu acizii nucleici.Ultimii joacă rol esenţial în conservarea şi transmiterea informaţiei genetice,care se realizează în organismul viu pe calea sintezei proteinelor specifice.

Acizii nucleici sînt substanţe polimere,macromoleculare, constituite prin repetarea multiplă a cîtorva monomeri de bază numiţi mononucleotide sau simplu nucleotide.Există două tipuri de acizi nucleici: acidul dezoxiribonucleic(ADN) şi acidul ribonucleic(ARN) care se deosebesc după structura lor chimică.

Unitatea monomeră a ADN este dezoxiribonucleotida.Drept component glucidic în dezoxiribonucleotidele ADN intră pentoza 2-dezoxi-β-D-ribofuranoza.In calitate de baze azotate,reprezentînd agliconii,în marea majoritate a nucleotidelor ADN se întîlnesc 4 compuşi heterociclici cu răspîndire universală : adenina(6-aminopurina),guanina(2-amino-6-hidroxipurina),citozina(2-hidroxi-6-aminopirimidina) şi timina(2,6-dihidroxi-5-metilpirimidina).Dezoxiribonucleotidele se unesc între ele prin legături 3',5'-fosfodiesterice.

Unitatea monomeră a ARN este ribonucleotida.Toate ribonucleotidele conţin pentoza β-D-riboza în forma β-furanozică.ARN include în structura sa două baze purinice(adenina şi guanina) şi două baze pirimidinice(citozina şi uracilul sau 2,6-dihidroxipirimidina).In catena ARN mononucleotidele sînt înlănţuite prin legături 3',5'-fosfodiesterice.

11.1.1.DETERMINAREA ADN

ADN constituie substratul material al eredităţii la majoritatea organismelor vii.In celulele eucariote majoritatea ADN este concentrată în nucleul celular.ADN s-a descoperit,de asemenea,în citoplasmă,mitocondrii şi în cloroplaste.

11.1.1.1.DETERMINAREA CONCENTRATIEI ADN PRIN METODA BURTON

Principiul metodei.Această metodă reprezintă o modificaţie a metodei Dische pentru determinarea cantitativă a ADN după reacţia de culoare cu difenilamina în amestec de acid acetic şi acid sulfuric la 100^{o}C.Sensibilitatea metodei a fost crescută de Burton prin introducerea în reacţie a acidului percloric şi acetaldehidei,urmată de incubarea amestecului timp de 17 ore la 30^{o}C.

Reactivi.1.Soluţie de difenilamină.Se dizolvă 1,5 g de difenilamină în 100 ml acid acetic glacial şi la soluţia obţinută se adaugă 1,5 ml H_2SO_4 concentrat.Reactivul se păstrează la întuneric.Inainte de întrebuinţare 20 ml soluţie de difenilamină se amestecă cu 0,1 ml soluţie apoasă de acetaldehidă 1,6%.

2.Soluţie de acid percloric($HClO_4$) 1 N.

3.Soluţie "sare-citrat".Se amestecă 10 volume de soluţie de NaCl 1,5M cu 1 volum soluţie de citrat trisodic 0,15 M.

4.Soluţie standard de ADN.Pentru obţinerea soluţiei standard de ADN,necesară la construirea curbei etalon,se pot folosi preparate macromoleculare de ADN din timusul de viţel sau din sperma de somon.Peste 1 mg de ADN se toarnă 1 ml apă distilată şi se lasă 24 de ore în frigider.La gelul de ADN se adaugă apă şi soluţie "sare-citrat"(reactiv 3) încît să se obţină 5-6 ml soluţie de ADN. Scuturînd de cîteva ori eprubeta se reuşeşte dizolvarea completă a ADN.

Soluţia standard de ADN se poate pregăti plecînd de la o soluţie stoc de ADN,care se obţine prin dizolvarea ADN în soluţie de NaOH 5 mM,astfel ca concentraţia ADN în soluţie să fie de 0,5-1,0 mg/ml.La 0^{o}C soluţia stoc de ADN este stabilă timp de 6 luni. Soluţiile standard de ADN se realizează lunar,amestecînd volume

egale de soluţie stoc de ADN şi soluţie de $HClO_4$ 1 N. Acest amestec se încălzeşte la 70°C timp de 15 minute şi se diluează cu soluţie de $HClO_4$ 0,5 N pînă la concentraţia necesară.

Concentraţia exactă a soluţiei standard de ADN se determină spectrofotometric prin metoda Spirin. In acest scop 0,1 ml soluţie standard de ADN se diluează la 3 ml cu soluţie de $HClO_4$ 0,5N şi se introduc timp de 15 minute într-o baie de apă la fierbere. Drept rezultat se produce hidroliza completă a ADN în dezoxiribonucleotide. Proba se răceşte şi se măsoară extincţia soluţiei la 270 şi 290 nm faţă de un control tratat identic. Concentraţia ADN în soluţia analizată se calculează după formula :

$$C_{ADN} = \frac{E_{270-290} \cdot 10{,}1 \cdot n}{0{,}19} ,$$

unde: C_{ADN} - concentraţia ADN, în micrograme/ml ;

$E_{270-290}$ - diferenţa extincţiilor la 270 şi 290 nm ;

n - gradul de diluare a soluţiei standard de ADN în probă.

Modul de lucru. Inainte de efectuarea reacţiei de culoare, soluţia de ADN se diluează cu un volum egal de soluţie de $HClO_4$ 1 N şi se supune hidrolizei timp de 20 minute la 80°C. La 1 ml hidrolizat acid conţinînd 5-80 micrograme de ADN, se adaugă 2 ml soluţie de difenilamină şi proba se lasă timp de 17 ore într-un termostat la 30°C. Intensitatea culorii amestecului de reacţie se determină cu ajutorul spectrofotometrului la 600 nm, faţă de proba de control conţinînd în locul soluţiei de ADN soluţie de $HClO_4$ 0,5 N care s-a incubat în condiţii identice.

Calculul rezultatelor. Concentraţia ADN în probă se estimează după curba etalon. Aceasta se obţine tratînd cantităţi de la 1 la 50 micrograme de ADN la fel cu proba de cercetat.

11.1.1.2. DETERMINAREA ADN PRIN METODA BURTON IN MODIFICATIA LUI GILES SI MYERS

Giles şi Myers au ridicat sensibilitatea metodei, mărind concentraţia difenilaminei pînă la 4% şi scăzînd intensitatea culorii controlului. Pentru aceasta din compoziţia reactivului difenilaminic a fost exclus acidul sulfuric; aciditatea sistemului a rămas nemodificată datorită creşterii concentraţiei acidului percloric de la 0,5 la 1,0 N. Acetaldehida se adaugă direct în probe.

Prin incubarea probelor cu difenilamină 4% adesea se produce precipitarea impurităţilor existente în preparatele de ADN obţinute din obiectele vegetale. Această sursă de eroare se poate anula dacă se determină diferenţa extincţiilor la 595 şi 700 nm şi se construieşte curba etalon "concentraţia ADN-diferenţa $E_{595-700}$".

Reactivi. 1. Soluţie de difenilamină 4% în acid acetic glacial. Se prepară înainte de întrebuinţare.

2. Soluţie de acetaldehidă 1,6 mg/ml în apă distilată. Se păstrează în flacon de culoare închisă la frigider.

Modul de lucru. La 2 ml hidrolizat de ADN se adaugă 2 ml soluţie de difenilamină 4% şi 0,1 ml soluţie de acetaldehidă. Probele se incubează la 30°C timp de 17 ore. Extincţia probelor colorate se măsoară la 595 şi 700 nm.

Calculul rezultatelor. Concentraţia ADN în probă se află folosind curba de etalonare.

11.1.2. DETERMINAREA CONCENTRATIEI ARN

Principiul metodei. Prin încălzirea soluţiei de ARN în prezenţa orcinolului, HCl şi $FeCl_3$ (catalizator) se dezvoltă o culoare verde.

Reactivi. 1. Soluţie de orcinol sau orcină (5-metilrezorcină) 6% în etanol 96%. Se prepară în momentul utilizării.

2. Soluţie de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,05% în acid clorhidric concentrat.

3. Soluţie standard de ARN. Mai întîi se prepară o soluţie de ARN 0,05%. Cantitatea de ARN se dizolvă într-un ml de soluţie de NaOH 1 N şi se lasă la temperatura camerei timp de 1-2 ore.

Soluţia de ARN se neutralizează cu soluţie de $HClO_4$ şi se diluează pînă la 50-80 micrograme/ml cu soluţie de $HClO_4$ 0,5 N.Pentru determinarea concentraţiei finale a ARN,cu ajutorul metodei Spirin,un volum determinat de soluţie conţinînd 10-30 micrograme de ARN se diluează la 3 ml cu soluţie de $HClO_4$ 0,5 N şi se hidrolizează pe baie de apă la fierbere în decurs de 15 minute.Proba se răceşte la temperatura camerei şi se măsoară extincţia soluţiei la 270 şi 290 nm faţă de un control realizat în mod analog.Concentraţia ARN se calculează după formula :

$$C_{ARN} = \frac{\Delta E_{270-290} \cdot 10,5 \cdot n}{0,19} ,$$

unde : C_{ARN} - concentraţia ARN,în micrograme/ml ;

$\Delta E_{270-290}$ - diferenţa extincţiilor la 270 şi 290 nm ;

n - gradul de diluare a soluţiei standard de ARN în probă.

Modul de lucru.Intr-o eprubetă termorezistentă cu şlif se introduce 1 ml probă conţinînd 20-400 micrograme ARN,se adaugă 1 ml soluţie de $FeCl_3$ şi 0,1 ml soluţie de orcinol.Amestecul se încălzeşte în baia de apă la fierbere timp de 20 minute şi apoi se răceşte într-o baie cu gheaţă.Culoarea verde dezvoltată se stabilizează prin adăugarea a 0,9 ml etanol 96%.Extincţia probelor se determină cu ajutorul spectrofotometrului la 650 nm faţă de controlul corespunzător.

Calculul rezultatelor. Concentraţia ARN se apreciază după curba de etalonare construită cu soluţia standard.

11.1.3.DETERMINAREA CANTITATIVA A ACIDULUI URIC

Acidul uric este produsul final al catabolismului bazelor purinice(fig.11.1) rezultate prin hidroliza enzimatică a acizilor nucleici în organismul omului şi primatelor.La unele reptile (şerpi,şopîrle) şi la păsări azotul se elimină din organism în principal sub formă de acid uric.Eliberarea bazelor purinice din molecula acizilor nucleici are loc conform următoarei secvenţe de reacţii :

Acizii nucleici $\xrightarrow{\text{Nucleaze}}$ Mononucleotide $\xrightarrow{\text{Nucleotidaze}}$

Nucleozide $\xrightarrow{\text{Nucleozidaze}}$ Adenină + Guanină

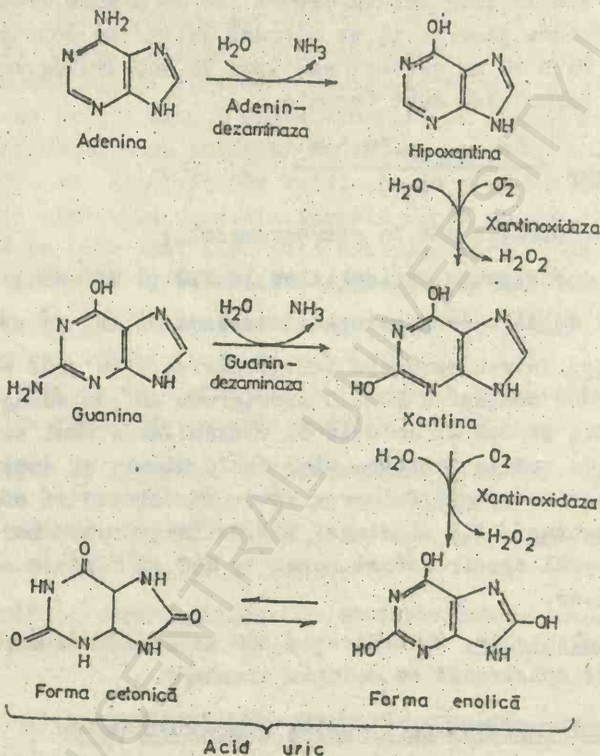
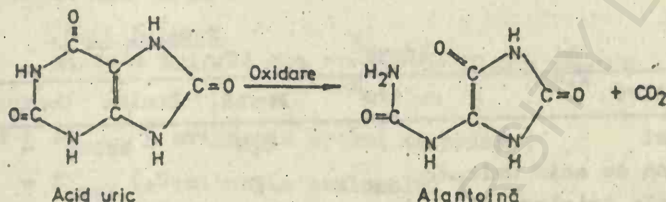


Fig.11.1. Catabolizarea bazelor purinice la acid uric

11.1.3.1. DOZAREA ACIDULUI URIC IN SINGE

Principiul metodei. Acidul uric reduce, în mediu alcalin, reactivul fosfowolframic (reactivul Folin) la un complex de culoare albastră. Prin această reacţie acidul uric este oxidat în alantoină şi dioxid de carbon :



Intensitatea culorii complexului format, proporţională cu concentraţia acidului uric în proba de analizat se determină colorimetric.

Reactivi. 1. Reactiv fosfowolframic (reactiv Folin). Se amestecă 10 g wolframat de sodiu cu 75 ml apă distilată şi 8 ml acid ortofosforic 85% într-un balon de 200-250 ml. La balon se adaptează un refrigerent ascendent şi se fierbe conţinutul timp de 4-6 ore. După fierbere soluţia din balon devine incoloră. Dacă soluţia nu se decolorează, se adaugă 1-2 picături de brom. Pentru îndepărtarea excesului de brom soluţia se fierbe fără refrigerent timp de 10-15 minute. După răcire soluţia din balon se transvazează într-un balon cotat de 100 ml şi se completează volumul la semn cu apă distilată.

2. Soluţie de acid tricloracetic 20%.

3. Soluţie stoc de acid uric 20 mg%. Se introduc 100 mg de acid uric într-un balon cotat de 500 ml şi se adaugă 25 ml soluţie de carbonat de litiu 0,5% şi 25 ml de apă distilată. După dizolvarea acidului uric se pipetează în balon 12,5 ml formol şi se completează volumul la semn cu apă distilată. Soluţia de acid uric este stabilă aproximativ o lună de zile.

4. Soluţie etalon de acid uric 2 mg%. Se diluează 1 ml soluţie stoc de acid uric 20% la 10 ml cu apă distilată. Un ml de soluţie etalon conţine 0,02 mg de acid uric.

5. Soluţie saturată de carbonat de sodiu.

Modul de lucru. Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 1 ml de ser sanguin, 2 ml de apă distilată şi 1 ml soluţie de acid tricloracetic. Conţinutul eprubetei se amestecă prin scuturarea uşoară a acesteia şi se lasă la temperatura camerei 15 minute. Apoi se centrifughează la 3000 rot./min., timp de 15 minute. Succesiunea ulterioară a operaţiilor este indicată în tabelul 11.1.

Tabelul 11.1.

Reactivi	Probă	Etalon	Control
Supernatant, ml	2,0	-	-
Soluţie etalon de acid uric, ml	-	0,5	-
Soluţie de acid tricloracetic, ml	-	0,5	0,5
Apă distilată, ml	-	1,0	1,5
Soluţie saturată de Na_2CO_3, ml	0,9	0,9	0,9
Reactiv fosfowolframic, ml	0,1	0,1	0,1

Se agită şi se lasă 10 minute la temperatura camerei. Se dedermină extincţia probei cu ser şi a etalonului, faţă de control, la 710 nm.

Calculul rezultatelor se efectuează după formula :

$$\text{mg acid uric/100 ml ser} = \frac{E_{probă}}{E_{etalon}} \cdot 0{,}01 \cdot \frac{4}{2} \cdot 100 ,$$

unde : $E_{probă}$ -extincţia probei cu ser ;

E_{etalon} -extincţia etalonului .

11.1.3.2. DOZAREA ACIDULUI URIC IN URINA

Pentru principiul metodei şi reactivi vezi "Dozarea acidului uric în sînge".

Modul de lucru. Urina din 24 de ore se recoltează într-un vas cu 10 ml hidroxid de sodiu 10% pentru a împedica precipitarea uraţilor. Se diluează 1 ml urină la 10 ml cu apă distilată.

La 0,2 ml urină diluată se adaugă 1,8 ml apă distilată, 0,9 ml soluţie saturată de carbonat de sodiu şi 0,1 ml reactiv fosfowol-

framic. Se amestecă şi se lasă în repaus 10 minute.

In paralel se prepară un etalon şi un control în condiţii identice.

Se măsoară extincţia probei cu urină şi a etalonului, faţă de control, la 710 nm.

Calculul rezultatelor. Concentraţia acidului uric în urina din 24 de ore va fi :

$$mg\ acid\ uric/24\ ore = \frac{E_{probă}}{E_{etalon}} x0,01x \frac{10}{0,2} xV \quad ,$$

unde : $E_{probă}$ - extincţia probei cu urină ;

E_{etalon} - extincţia etalonului ;

V - volumul(ml) urinii din 24 ore.

Importanţa practică a dozării acidului uric. Valorile normale ale concentraţiei acidului uric sînt de 2-5 mg/100 ml ser sanguin şi de 400-700 mg/volumul de urină din 24 de ore.

Creşterea cantităţii de acid uric în sînge şi în urină se constată după o alimentaţie bogată în purine.

Dozarea acidului uric în sînge şi urină are o deosebită însemnătate pentru diagnosticarea stadiilor iniţiale ale bolilor de rinichi şi gutei.

Conţinutul de acid uric în sînge şi urină creşte într-o serie de stări patologice, corelate cu catabolizarea intensă a nucleoproteinelor: leucemii după radioterapie, leucopenie, policitemie, insuficienţă renală, alergie, intoxicaţii cu plumb şi mercur.

Scăderea nivelului acidului uric în serul sanguin şi urină se observă în anemii, după administrarea de medicamente uricozurice etc.

11.2. STUDIUL CROMOPROTEINELOR

Cromoproteinele sînt proteine complexe avînd drept grupare prostetică diferite metalporfirine. Ca reprezentanţi tipici ai cromoproteinelor se menţionează hemoglobinele, mioglobinele, cloroplastina, unele oxidoreductaze (catalază, peroxidază, citocromi) etc.

11.2.1. DOZAREA BILIRUBINEI IN SINGE

Bilirubina se formează în organismul uman şi animal prin catabolizarea hemoglobinei în sistemul reticulohistocitar, ficat, splină etc.

La început nucleul porfirinic din molecula hemoglobinei suferă o scindare oxidativă la nivelul grupei α-metinice dintre ciclurile pirolice I şi II ale hemului, cu oxidarea simultană a fierului bivalent în trivalent. In urma acestei transformări oxidative apare o substanţă de culoare verde, numită verdoglobină sau coleglobină, care pe lîngă nucleul porfirinic deschis conţine încă globina şi fierul trivalent. In fazele următoare ale procesului catabolic verdoglobina pierde atomul de fier şi globina. Ca rezultat se formează un pigment biliar, de culoare verde, numit biliverdina. Prin reducerea enzimatică a biliverdinei ia naştere bilirubina, substanţă colorată în roşu, care constituie principalul pigment al bilei şi un component normal al sîngelui. Schematic procesul de catabolizare a hemoglobinei în bilirubină este redat în fig. 11.2.

Bilirubina liberă din sînge, datorită insolubilităţii ei în apă, nu trece în urină. Această bilirubină liberă se numeşte bilirubină indirectă sau extrahepatică. Din sînge bilirubina liberă pătrunde în ficat, unde se conjugă, în marea ei majoritate cu acidul uridindifosfat-glucuronic, rezultînd astfel glucuronidbilirubina şi diglucuronidbilirubina. Bilirubina conjugată, cunoscută sub numele de bilirubină directă sau hepatică posedă o solubilitate bună în apă. Datorită acesteia, bilirubina directă este excretată prin bilă în duoden şi de aici trece în intestinul subţire, unde este transformată în continuare în alţi pigmenţi biliari.

Concentraţia sanguină de bilirubină constantă în condiţii normale, poate să crească în diferite forme de icter. Nivelul

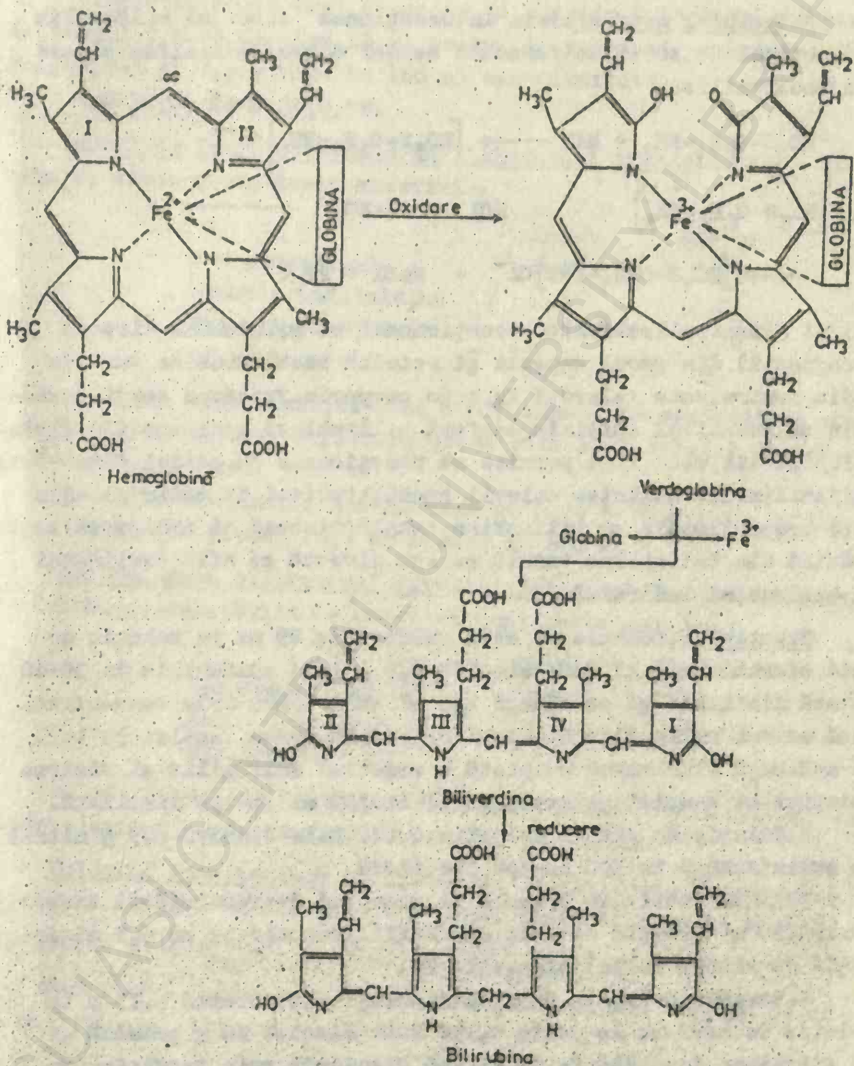
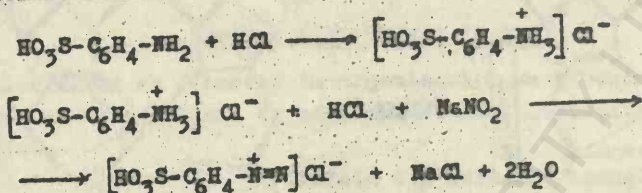


Fig.11.2. Catabolizarea hemoglobinei în bilirubină

sanguin al bilirubinei,ușor de urmărit experimental,oferă un test comod pentru explorarea stării fundamentale a ficatului.

Principiul metodei.Prin interacțiunea acidului sulfanilic cu azotitul de sodiu se formează acidul diazofenilsulfonic(acid diazosulfanilic) :



$$HO_3S-C_6H_4-NH_2 + HCl \longrightarrow [HO_3S-C_6H_4-\overset{+}{N}H_3]Cl^-$$

$$[HO_3S-C_6H_4-\overset{+}{N}H_3]\ Cl^- + HCl + NaNO_2 \longrightarrow$$

$$\longrightarrow [HO_3S-C_6H_4-\overset{+}{N}{\equiv}N]Cl^- + NaCl + 2H_2O$$

Acidul diazofenilsulfonic reacționează cu bilirubina directă (conjugată) din serul sanguin și rezultă azobilirubina care,în mediu neutru,este colorată în roșu purpuriu.Tratarea serului sanguin cu reactivul cofeinic conferă bilirubinei indirecte(libere) solubilitate,ceea ce-i permite să reacționeze cu acidul diazosulfanilic.Intensitatea culorii azobilirubinei în mediu alcalin este proporțională cu bilirubina totală(directă și indirectă). Scăzînd din bilirubina totală pe cea directă se află conținutul de bilirubină indirectă.

Reactivi.1.Soluție de acid sulfanilic 29 mM în soluție de acid clorhidric 0,17 N.Se dizolvă 0,5 g acid sulfanilic în 30-40 ml apă distilată și se adaugă 1,5 ml acid clorhidric concentrat. Dacă acidul sulfanilic se dizolvă greu,se poate încălzi pe baie de apă.După dizolvarea completă a acidului sulfanilic și răcirea soluției se completează volumul ei la 100 ml cu apă distilată.

2.Soluție de nitrit de sodiu 0,072 M.Se dizolvă 0,5 g nitrit de sodiu($NaNO_2$) în 100 ml apă distilată.

3.Diazoreactiv.Se prepară în momentul întrebuințării amestecînd 10 ml soluție de acid sulfanilic(reactiv 1) cu 0,3 ml soluție de nitrit de sodiu(reactiv 2).

4.Reactiv cofeinic.Soluția A:soluție de cofeină 0,13 M în soluție de benzoat de sodiu 0,156 M.Se dizolvă 10 g cofeină și 15 g benzoat de sodiu în 90 ml apă distilată prin încălzire pe baia de apă.După răcire se completează volumul soluției la 100 ml cu apă distilată.Soluția B:soluție de acetat de sodiu 25%.

Reactivul cofeinic se prepară extemporaneu prin amestecare de volume egale a soluţiilor A şi B.

5. Soluţie de tartrat de sodiu şi potasiu 0,93 M în soluţie de NaOH 1,9 N. Se dizolvă 15 g tartrat de sodiu şi potasiu (sare Seignette) şi 7,5 g NaOH în 100 ml apă distilată.

6. Soluţie de NaCl 0,9%.

Modul de lucru. Determinarea bilirubinei totale. In două eprubete se măsoară următorii reactivi :

	Probă	Martor
Ser sanguin, ml	0,25	0,25
Reactiv cofeinic, ml	1,0	1,0
Soluţie de NaCl, ml	-	0,25
Diazoreactiv, ml	0,25	-

Se agită eprubetele, se lasă 10-30 minute la temperatura camerei, apoi se adaugă în fiecare probă cîte 1 ml soluţie de tartrat alcalin (reactiv 5).

Se agită conţinutul eprubetelor şi după 5-30 minute se citeşte extincţia probei faţă de martor la 600 nm.

Determinarea bilirubinei directe (conjugate). In două eprubete se introduc cantităţile de reactivi menţionate mai jos :

	Probă	Martor
Ser sanguin, ml	0,5	0,5
Soluţie de NaCl, ml	1,75	2,0
Diazoreactiv, ml	0,25	-

Se agită, se lasă la temperatura camerei exact 5 minute şi se citeşte extincţia probei faţă de martor la 530 nm.

Calculul rezultatelor. Coeficienţii de extincţie procentuală ai azobilirubinei la 600 şi 530 nm sînt egali cu 1150 şi respectiv 943. De aici $E^{600}_{1mg/100ml} = 1,15$ şi $E^{530}_{1\,mg/100ml} = 0,943$.

Cantitatea de bilirubină totală în 100 ml ser sanguin se află cu ajutorul formulei :

$$\text{mg bilirubină/100 ml} = \frac{E^{600}}{1,15} \cdot \frac{2,5}{0,25}$$

Pentru calcularea conţinutului de bilirubină directă se foloseşte formula :

$$mg\ bilirubină/100\ ml = \frac{E^{530}}{0,934} \cdot \frac{2,5}{0,5}$$

Nivelul bilirubinei libere în serul sanguin se află scăzînd valoarea bilirubinei directe din cea a bilirubinei legate.

Observaţii.1.Dozarea bilirubinei se efectuează în ser nehemolizat şi la cel mult două ore de la recoltarea serului.

2.In cazul unei concentraţii ridicate de bilirubină serul sanguin se diluează 1/2-1/4 cu soluţie de NaCl 0,9%,iar rezultatul se înmulţeşte cu factorul de diluţie.

Importanţa practică.Concentraţia bilirubinei totale în sîngele omului sănătos este de pînă la 1 mg/100 ml ser.Conţinutul bilirubinei conjugate(directe) poate să atingă valoarea de 0,25 mg/100 ml ser.Bilirubina liberă(indirectă) se află prin scăderea valorii bilirubinei conjugate din cea a bilirubinei totale.

Determinarea bilirubinei totale şi a fracţiilor ei prezintă o mare însemnătate clinică,ajutînd în stabilirea diagnosticului diferitelor boli.

Icterele hepatice(hepatite,ciroze) sînt însoţite de creşterea conţinutului de bilirubină totală şi conjugată.O oarecare creştere a cantităţii de bilirubină liberă se observă în insuficienţa hepatică.

Bibliografie :3,20,21,29,33,43

12. VITAMINE SI HORMONI

12.1. DETERMINAREA VITAMINELOR

Vitaminele reprezintă substanţe organice biologic active, cu structură chimică variată şi masă moleculară relativ mică, care sînt absolut necesare pentru desfăşurarea normală a proceselor biologice, inclusiv biochimice în organismul viu, precum şi a funcţiilor organelor acestuia.

Multe vitamine intră în compoziţia enzimelor bicomponente, condiţionînd activitatea catalitică a acestora.

Unele organisme, de exemplu, microorganismele şi plantele pot sintetiza toate vitaminele necesare lor. Organismele animale, cu puţine excepţii, nu au capacitatea de a sintetiza vitamine. Omul obţine vitaminele din produsele alimentare, iar animalele le primesc cu furajele.

Determinarea vitaminelor în plante şi animale se cere în primul rînd pentru aprecierea valorii nutritive şi furajere a produselor de provenienţă vegetală sau animală.

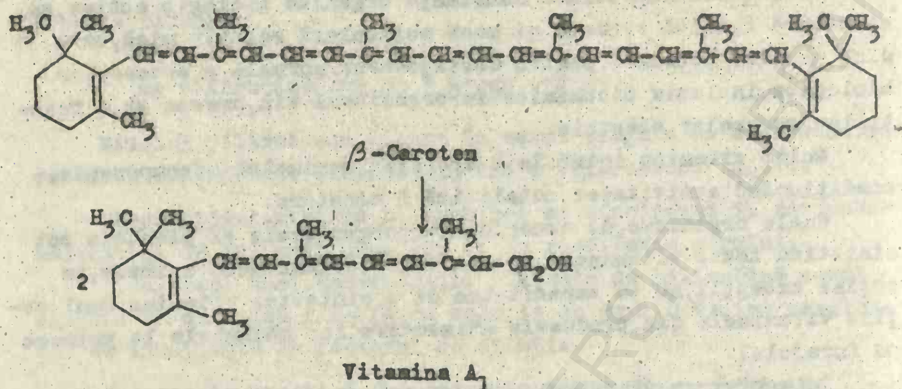
Comparativ cu alţi compuşi biochimici (glucide, aminoacizi, acilgliceroli etc.), vitaminele se găsesc în ţesuturile vegetale şi animale în cantităţi foarte mici. Diferite vitamine, ca de exemplu, vitaminele A şi D se întîlnesc în ţesuturile vii sub formă de precursori numiţi provitamine.

12.1.1. DOZAREA CAROTENILOR

Carotenii sau provitaminele A aparţin grupei carotenoidelor care sînt pigmenţi de culoare galben-portocaliu, alcătuiţi din resturi izoprenice. Deşi carotenii au o largă răspîndire în regnul vegetal şi animal, ei pot fi sintetizaţi numai de plante.

Din punct de vedere structural carotenii sînt hidrocarburi nesaturate, avînd la capătul catenei alifatice cel puţin un ciclu parţial saturat. In natură carotenii există sub formă de 5 izomeri, care se desemnează prin literele alfabetului grecesc. Introduşi cu alimentele în organismul animal carotenii sînt scindaţi enzimatic în vitamină A_1. Cea mai mare activitate biologică posedă β-carote-

nul, a cărui scindare conduce la 2 molecule de vitamină A_1.



Carotenii nu se dizolvă în apă, ci în unii solvenţi organici (eter, acetonă, alcool).

<u>Dozarea</u> <u>carotenilor</u> <u>în</u> <u>plante</u>

<u>Principiul</u> <u>metodei</u>. Materialul vegetal se triturează cu un amestec de sulfat de sodiu anhidru şi oxid de calciu, care reţin substanţele colorate în afară de caroteni. Pentru a preveni descompunerea carotenilor în mediu acid se adaugă la amestec carbonat de sodiu anhidru. Carotenii din amestecul triturat se extrag cu acetonă şi eter de petrol sau benzină. În extractul obţinut se determină colorimetric, direct sau după o prealabilă purificare cromatografică pe coloană cu oxid de aluminiu conţinutul de caroteni în materialul analizat.

<u>Reactivi</u>. 1. Acetonă p.a.

2. Hexan p.a.

3. Sulfat de sodiu anhidru p.a.

4. Oxid de calciu.

5. Carbonat de calciu anhidru p.a.

6. Eter de petrol (p.f. 55-70°C) sau benzină cu p.f. 70-80°C.

7. Fosfat dicalcic p.a.

8. Soluţie etalon de azobenzen. Se dizolvă 14,5 mg de azobenzen (recristalizat din alcool etilic) în 100 ml de etanol 96%. Intensitatea culorii acestei soluţii corespunde cu cea a unei

soluţii conţinînd 0,00235 mg caroten într-un ml.

9.Soluţie etalon de dicromat de potasiu.Se dizolvă 72 mg de dicromat de potasiu în 100 ml apă distilată.Extincţia acestei soluţii corespunde unui conţinut de 0,00416 mg caroten în 1 ml.

Modul de lucru.Extracţia produselor vegetale uscate.Intr-un flacon conic cu dop rodat se introduce o cantitate exact cîntărită de material vegetal mărunţit cît mai fin posibil: la un conţinut în caroten mai mare de 10 mg% se va lua 1 g material,la 5mg% se vor lua 2 g şi 4 g la un conţinut mai mic de 5 mg%.Se adaugă 30 ml amestec de acetonă cu hexan(3:7) şi se lasă la temperatura camerei,timp de 15-24 ore,la întuneric.

Extractul se filtrează prin decantare într-un balon cotat de 100 ml conţinînd 9 ml acetonă,se spală reziduul de cîteva ori cu volume mici de hexan şi se completează la semn cu acelaşi solvent.

Extracţia materialului vegetal proaspăt.O probă de 0,1-10 g (în funcţie de conţinutul presupus de caroteni) din materialul vegetal proaspăt,în prealabil mărunţit,se triturează într-un mojar cu o cantitate dublă în greutate de nisip de cuarţ sau sticlă pisată,pînă la completa dispariţie a elementelor structurale vegetale şi obţinerea unui amestec omogen.Intrucît carotenii sînt instabili la pH acid,în timpul mojarării se adaugă un vîrf de spatulă de carbonat de sodiu anhidru pentru neutralizarea acizilor.De asemenea,se adaugă o cantitate de sulfat de sodiu anhidru aproximativ egală cu aceea a probei cîntărite cu scopul de a fixa apa din materialul vegetal şi o cantitate echivalentă de oxid de calciu,pentru reţinerea clorofilei şi xantofilei.Amestecul se mojarează pînă se transformă într-o pulbere fină de culoare galbenverzuie.

In mojar se pipetează 5-20 ml de acetonă şi se continuă mojararea încă cîteva minute.Apoi conţinutul mojarului se trece cantitativ într-un pahar Berzelius de 50 ml sau într-o eprubetă, spălînd mojarul de mai multe ori cu cantităţi mici de acetonă. După ce materialul se lasă timp de 15-20 minute în contact cu acetona,se varsă extractul acetonic,prin decantare,într-o pîlnie de separare.Se repetă extracţia materialului din pahar sau eprubetă,cu cantităţi mici de acetonă de 4-10 ori,pînă cînd acetona

folosită în acest scop rămîne incoloră.

Extractul acetonic din pîlnia de separare se amestecă cu 10-20 ml de benzină sau eter de petrol. Acetona din amestec se îndepărtează prin spălare cu apă distilată. In acest scop se introduc în pîlnia de separare 10-20 ml apă distilată şi se agită uşor. Se aşteaptă cîteva minute pînă are loc separarea distinctă a două straturi de lichide. Stratul inferior apoao-acetonic se elimină din pîlnie cu atenţie. Se repetă spălarea extractului din pîlnie cu apă încă de 2-3 ori. Ca rezultat carotenii trec complet în sratul de benzină sau de eter de petrol.

Soluţia benzinică sau eterică de caroteni se usucă de urmele de apă prin amestecare cu 1-5 g de sulfat de sodiu anhidru, urmată de filtrare. La filtratul obţinut se adaugă 0,5-1g de fosfat dicalcic pentru izolarea clorofilei şi xantofilei. Soluţia de caroteni se filtrează şi se completează la volum cunoscut cu benzină sau eter de petrol.

Dozarea colorimetrică directă a carotenilor în soluţia benzinică(eterică). Măsurarea intensităţii culorii soluţiei benzinice(eterice) de caroteni, obţinută în modul descris mai sus, se poate efectua la electrofotocolorimetru sau spectrofotometru, folosind lungimea de undă de 450 nm(filtru albastru), iar pentru compensaţie benzina sau eterul de petrol.

Dozarea carotenilor după separarea prin cromatografia de adsorbţie pe oxid de aluminiu. Separarea carotenilor de pigmenţii însoţitori se realizează cu ajutorul cromatografiei de adsorbţie pe oxid de aluminiu, cu folosirea în calitate de fază lichidă a eterului de petrol. La partea inferioară a unei coloana cromatografice, cu lungimea de 12-16 cm şi diametrul de 1-1,5 cm(fig.12.1) se fixează un tampon de vată de sticlă sau medicinală de 0,5-1 cm grosime. In coloană se introduc porţiuni mici de oxid de aluminiu cu umiditatea de 4%, tasînd uşor cu o baghetă de sticlă adsorbantul. Inălţimea stratului de adsorbant trebuie să atingă 7-10 cm. Deasupra adsorbantului se aşază un strat de vată şi unul de sulfat de sodiu anhidru, cu grosimea de 0,5 cm. Soluţia de caroteni în eter de petrol se filtrează prin coloana cromatografică cu o viteză de 60 picături pe minut. In timpul cromatografierii este

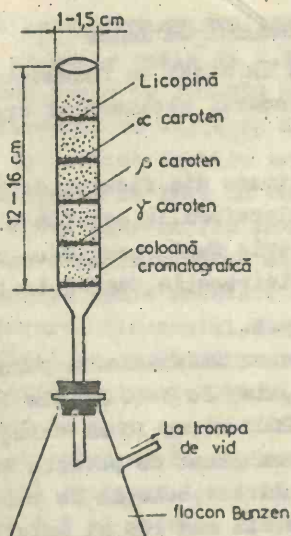


Fig.12.1.Separarea cromatografică a carotenilor pe oxid de aluminiu

necesar ca deasupra umpluturii coloanei să fie tot timpul un strat de solvent,întrucît carotenii se oxidează la contactul cu aerul.După adsorbția soluției de caroteni pe oxidul de aluminiu,adsorbantul se spală cu eter de petrol pînă ce zonele galbene de caroten se eluează complet din coloană.Spălarea coloanei se consideră terminată,cînd eluatul devine complet transparent.Soluția de caroten se adună într-un balon cotat de 25-50 ml și se completează cu eter de petrol la semn.

Cantitatea de caroten în eluatele obținute se determină prin colorimetrare la 450 nm,față de eterul de petrol.

Calculul rezultatelor.Pentru calcularea conținutului de caroten în probe se măsoară în aceleași condiții extincția soluției etalon de azobenzen sau dicromat de potasiu.

Cantitatea carotenilor în materialul vegetal cercetat se calculează după formula următoare :

$$mg\ caroten\ \% = \frac{E_1 . a . v . 100}{E_2 . p} ,$$

unde : E_1 - extincția probei de cercetat ;
E_2 - extincția soluției etalon ;
a - numărul mg de caroten într-un ml soluție etalon (0,00235 mg în cazul soluției de azobenzen și 0,00416 mg dacă s-a lucrat cu soluția de dicromat de potasiu) ;
v - volumul soluției de caroten,ml ;
p - greutatea materialului luat pentru analiză,g.

12.1.2. DOZAREA VITAMINEI A ŞI CAROTENILOR IN FICAT

Conţinutul de vitamină A şi caroten în ficat se foloseşte adesea ca criteriu de apreciere a satisfacerii necesarului organismului animal cu această vitamină.

Principiul metodei. Vitamina A se extrage din ficatul deshidratat cu eter etilic şi se dizolvă în cloroform. In soluţia cloroformică vitamina A se determină fotometric după reacţia cu soluţia cloroformică de triclorură de stibiu (reacţia Carr-Price).

Reactivi. 1. Sulfat de sodiu anhidru p.a.

2. Eter etilic lipsit de peroxizi. Pentru îndepărtarea peroxizilor 1 litru de eter etilic se amestecă, timp de 5-10 minute într-o pîlnie de separare sau un balon de 2000 ml, cu 10 ml soluţie de KOH(NaOH) 40% şi 100 ml soluţie de permanganat de potasiu 4%. După separarea completă a straturilor de lichid, soluţia de permanganat se elimină. In pîlnie se introduc din nou 100 ml soluţie de permanganat şi purificarea se repetă. Spălarea cu permanganat se continuă pînă cînd soluţia nou adăugată nu-şi schimbă culoarea. Eterul etilic purificat se spală cu apă distilată pentru înlăturarea urmelor de alcali, ceea ce se controlează cu ajutorul fenolftaleinei. In continuare eterul se usucă cu sulfat de sodiu anhidru şi se distilă la 40°C. Eterul pregătit astfel se păstrează în sticlă de culoare închisă pe sulfat de sodiu anhidru.

3. Cloroform fără urme de apă şi HCl. Aceasta se realizează prin 5-6 spălări cu apă distilată în raportul 2:1 şi uscare pe sulfat de sodiu anhidru. Cloroformul uscat se distilă şi se păstrează în sticlă închisă la culoare cu sulfat de sodiu anhidru.

4. Soluţie saturată de triclorură de stibiu. Preparatul comercial de triclorură de stibiu se spală cu cloroform pînă soluţia devine limpede. Apoi din preparatul spălat se prepară soluţie saturată de triclorură de stibiu (23-25%). Soluţia se poate folosi numai după un repaus de 24 ore la temperatura camerei.

5. Anhidridă acetică.

Modul de lucru. Se triturează într-un mojar 2-3 g ficat cu 10-15 g sulfat de sodiu anhidru pînă se obţine o pudră uscată. Se mojarează repede (1-2 minute) pentru a evita descompunerea vitaminei

A.Pulberea obţinută se trece cantitativ(dacă este necesar mojarul se poate spăla de 2-3 ori cu cîte 10 ml eter etilic) într-un flacon conic de 200-250 ml şi se adaugă eter etilic pînă la 100 ml.Flaconul se umple cu dioxid de carbon de la un aparat Kipp sau cu azot,se închide ermetic şi se agită conţinutul timp de 5 minute,apoi se lasă în repaus 60 minute la temperatura camerei (20-22°C) într-un loc întunecos sau se introduce în frigider pentru 2 ore.Extractul eteric se decantează şi se filtrează.Reziduul se spală succesiv cu 25,15 şi 10 ml eter de petrol prin scuturarea flaconului.Eterul de spălare,de asemenea,se filtrează. In final se spală filtrul cu 5-10 ml de eter.Extractul eteric adunat(aproximativ 150 ml) se evaporă pe baie de apă la 40°C în curent de azot sau dioxid de carbon.Reziduul rămas după evaporarea eterului se dizolvă în 1-5 ml cloroform(în dependenţă de conţinutul presupus de vitamină A).Pentru dozarea vitaminei A se măsoară 0,5 ml soluţie cloroformică în cuva electrofotocolorimetrului şi se adaugă 2-3 picături de anhidridă acetică.Cuva se fixează în suportul său şi se pipetează în ea 2,5 ml soluţie saturată de triclorură de stibiu.Cît mai repede posibil se citeşte extincţia probei la electrofotocolorimetru FEK-M,folosind filtrul 9 (630 nm) şi pentru comparaţie un control în care soluţia cloroformică de vitamină A se înlocuieşte cu 0,5 ml eter etilic.

Calculul conţinutului de vitamină A în proba analizată se efectuează cu ajutorul curbei etalon,construită prin procedeul obişnuit.Cantitatea de vitamină A într-un g de ficat se calculează după formula :

$$\text{micrograme vitamină A/1 g ţesut} = \frac{a \cdot v}{0,5 \cdot p} ,$$

unde : a - micrograme vitamină A corespunzătoare extincţiei probei de cercetat ;

v - volumul de cloroform,în ml,folosit pentru dizolvarea vitaminei A ;

p - greutatea ficatului luat pentru extracţie ,g.

Dacă este necesar să se determine simultan în ficat carotenul,analiza se execută în acelaşi mod pînă la obţinerea extractului eteric.Acesta se împarte în două părţi şi fiecare se evaporă

pe baie de apă.Apoi,unul din reziduuri se dizolvă în cloroform pentru dozarea vitaminei A după procedeul descris.Al doilea reziduu se dizolvă în 5 ml eter de petrol şi se supune cromatografiei pe coloană conform tehnicii descrise la dozarea carotenilor în în plante(pag.268).

12.1.3.DOZAREA VITAMINEI E

In plante au fost identificate 7 forme ale vitaminei E,numite tocoferoli,care sînt derivaţi metilaţi ai 2-(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-hidroxicromanului,combinaţie denumită prescurtat tocol.Dintre toţi tocoferolii cunoscuţi, α-tocoferolul sau 5,7,8-trimetiltocolul posedă cea mai mare activitate biologică.

Prin determinarea conţinutului de vitamină E în produsele vegetale de obicei se dozează suma tocoferolilor.

Metodele chimice de determinare a vitaminei E nu permit totdeauna o apreciere exactă a valorii biologice(vitaminice) a produsului cercetat,întrucît toţi tocoferolii dau prin oxidare chinone colorate,însă activitatea vitaminică diferă de la un tocoferol la alt tocoferol,iar conţinutul lor în ţesuturile vegetale nu este identic.

<u>Dozarea sumei tocoferolilor în seminţele de plante</u>.

<u>Principiul metodei</u>.In prezenţa clorurii ferice are loc oxidarea tocoferolilor la chinone.Totodată clorura ferică se reduce în clorură feroasă.Cantitatea de clorură feroasă se apreciază după intensitatea culorii ce se dezvoltă la adăugarea α,α'-dipiridilului sau orto-fenantrolinei,care complexează ferul bivalent.

<u>Reactivi</u>.1.Eter etilic.

2.Soluţie de KOH 10% în alcool etilic 96%.

3.Pirogalol.

4.Benzen

5.Diatomit(Kieselgur)

6.Sulfat de sodiu anhidru.

7.Soluţie de α,α'-dipiridil 0,5% în alcool etilic absolut.

8.Soluţie de orto-fenantrolină 0,5% în alcool etilic absolut.

9.Soluţie de clorură ferică($FeCl_3.6H_2O$) 0,2% în alcool etilic absolut.

Modul de lucru.O cantitate de 1-5 g de seminţe fin omogenizate se introduce într-un pachet din hîrtie de filtru şi se extrage cu eter de petrol în aparatul Soxhlet.Dizolvantul se îndepărtează prin încălzirea balonului pe baie de apă.La reziduul gras rămas în balon se adaugă 15 ml soluţie alcoolică de KOH 10% şi se saponifică cu refrigerent cu reflux pe baie de apă,timp de 45-60 minute în prezenţa unei cantităţi mici de pirogalol(50 mg). Conţinutul balonului se trece cantitativ într-o pîlnie de separare folosind un volum dublu de apă distilată(30-35 ml) şi fracţia nesaponificabilă se extrage cu eter etilic(lipsit de peroxizi) în cantitate de 40,35 şi 30 ml.Extractele eterice se unesc şi se spală în pîlnia de separare cu apă distilată pînă la reacţia negativă faţă de hîrtia de turnesol.Apoi,extractul eteric se usucă,filtrîndu-l printr-o coloană cu sulfat de sodiu anhidru. Extractul eteric uscat se transvazează într-un balon uscat şi se distilă dizolvantul în curent de dioxid de carbon sau de azot pe baia de apă.Reziduul se dizolvă în benzen şi se transferă într-un balon cotat de 25 ml,completînd la semn.

Din soluţia benzenică obţinută se iau 5-10 ml şi se aplică pe o coloană cu diatomit(Kieselgur),avînd înălţimea stratului de adsorbant de 1,5-3,5 cm şi diametrul de 1,5 cm.Tocoferolii se eluează de pe adsorbant cu 12-18 ml benzen.Eluatul se colectează cantitativ într-un balon cotat de 25 ml şi se completează la semn cu benzen.

Pentru efectuarea reacţiei de culoare se măsoară 10-15 ml eluat într-un balon cotat şi se adaugă 1 ml soluţie de α,α'-dipiridil sau de orto-fenantrolină.Apoi se introduce în balon cu picătura şi sub agitare 1 ml soluţie de clorură ferică.In prezenţa tocoferolilor conţinutul balonului începe să se coloreze în roşu. Volumul balonului se completează la semn cu benzen,se agită şi se lasă la întuneric timp de 10 minute.

Paralel cu proba se realizează controlul reactivilor,măsurînd aceleaşi cantităţi de benzen,soluţie de α,α'-dipiridil(orto-fenantrolină) şi clorură ferică într-un balon cotat de 25 ml.

Proba cu tocoferoli se colorimetrează la un fotoelectrocolo-

rimetru,utilizînd lungimea de undă de 490 nm şi controlul reactivilor pentru stabilirea punctului zero al aparatului.

Calculul rezultatelor.Pe curba de etalonare se află cantitatea de tocoferoli corespunzătoare extincţiei probei de cercetat. Conţinutul tocoferolilor în mg la 100 g material analizat(X) se calculează după formula :

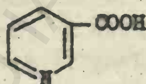
$$X = \frac{a.v.v_2.100}{p.v_1.v_3},$$

unde : a - cantitatea tocoferolilor,în mg,găsită pe curba de etalonare ;
v - volumul extractului iniţial(25 ml) ;
v_1- volumul soluţiei introdus în coloana cu adsorbant,ml;
v_2- volumul eluatului cules din coloana cu diatomit(25 ml)
v_3- volumul soluţiei luat pentru reacţia de culoare,ml ;
p - greutatea materialului cercetat,g.

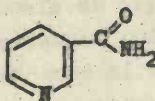
Construirea curbei de etalonare.Se dizolvă 50 mg α-tocoferol în 250 ml benzen,la balon cotat.Din această soluţie etalon se măsoară 0,25-2 ml în baloane cotate de 25 ml.Apoi se adaugă aceeaşi reactivi şi în aceeaşi succesiune ca şi la dozarea vitaminei E.Volumul probelor etalon se completează la semn cu benzen. Se agită şi se lasă la întuneric 10 minute.Se colorimetrează la 490 nm faţă de controlul reactivilor.

12.1.4. DOZAREA VITAMINEI PP

Termenul de vitamină PP desemnează acidul nicotinic(niacina) şi amida sa(nicotinamida) larg răspîndite în plante,mai ales în seminţe.



Acid nicotinic



Nicotinamida

Principiul metodei.Acidul nicotinic reacţionează cu bromura de tiocian formînd un compus care în prezenţa metolului dă un

produs colorat în galben. Intensitatea culorii este proporţională cu cantitatea de acid nicotinic.

Reactivi. 1. Soluţie de acid sulfuric 5 N.

2. Soluţie de acid sulfuric 2 N.

3. Soluţie de acid sulfuric 0,1 N.

4. Soluţie de fenolftaleină 1%.

5. Soluţie de NaOH 10 N.

6. Soluţie de NaOH 4 N.

7. Alcool izobutilic sau alcool etilic.

8. Soluţie de sulfat de zinc 80%.

9. Apă de brom. Se amestecă 4 ml de brom cu 100 ml apă distilată. După decantarea bromului nedizolvat se separă soluţia limpede şi se păstrează la întuneric.

10. Soluţie de tiocianat de potasiu sau amoniu 10%.

11. Soluţie de tiocianat de potasiu sau amoniu 1%.

12. Carbonat de calciu p.a.

13. Soluţie de brom-tiocian. Se pregăteşte înainte de întrebuinţare în modul următor : la apa de brom răcită pe gheaţă (luată în cantitatea necesară pentru analiză) se adaugă cu picătura soluţie de tiocianat de potasiu sau amoniu pînă la apariţia culorii galben deschis, iar în continuare soluţie de tiocianat 1% pînă la decolorare completă. Soluţia decolorată se tratează cu 20-50 mg carbonat de sodiu pînă la încetarea degajării CO_2 şi formarea de precipitat. Soluţia se filtrează şi se conservă în sticlă brună la rece. Prepararea reactivului se face sub nişă.

14. Soluţie stoc de acid nicotinic. Intr-un balon cotat de 50 ml se dizolvă 50 mg de acid nicotinic în apă distilată, acidulată cu 0,5 ml soluţie de acid sulfuric 10 N. După dizolvarea acidului nicotinic se completează la semn cu apă distilată. Se conservă la rece timp de 6 luni.

15. Soluţie etalon de acid nicotinic. In ziua analizei se diluează 0,5 ml soluţie stoc de acid nicotinic la 100 ml cu apă distilată. In 1 ml soluţie etalon se găsesc 0,005 mg acid nicotinic.

16. Soluţie de metol recristalizat 8% în soluţie de acid clorhidric 0,5 N. Se prepară extemporaneu.

Pentru obţinerea metolului recristalizat se amestecă 100 g

metol cu 0,7 g bisulfit de sodiu şi 500 ml soluţie de acid sulfuric 0,1 N încălzit la fierbere.Amestecul se încălzeşte din nou la fierbere.Dacă soluţia se colorează, se suplimentează cu cărbune activ şi se filtrează.La filtrat se adaugă 0,3 g bisulfit de sodiu,700 ml alcool etilic şi se lasă într-o baie de apă cu gheaţă,la întuneric,pentru cîteva ore.Cristalele formate se separă prin filtrare,se spală cu etanol şi se usucă în aer,la întuneric.

Modul de lucru.O cantitate de 3-5 g de material vegetal, conţinînd circa 100 micrograme de acid nicotinic,se mojarează cu un volum mic de soluţie de acid sulfuric 2 N.Omogenatul obţinut se trece cantitativ într-un balon cotat de 50 ml,spălînd mojarul cu soluţie de acid sulfuric 2 N(volumul total al soluţiei întrebuinţate pentru mojarare şi spălare nu trebuie să depăşească 40 ml).Balonul se introduce într-o baie de apă la fierbere timp de 90 minute,conţinutul lui agitîndu-se periodic.In acest interval de timp se hidrolizează multe glucide complexe şi alte substanţe. La terminarea hidrolizei,balonul se răceşte ,se completează la semn cu apă distilată şi se filtrează .Primii mililitri de filtrat se aruncă.

Se iau 25 ml filtrat într-un balon cotat de 50 ml,se adaugă 1-2 picături de soluţie de fenolftaleină şi soluţie de NaOH 10 N pînă la apariţia unei culori slab-roz.Excesul de hidroxid de sodiu se neutralizează cu 1-2 picături de soluţie de acid sulfuric 5 N.După răcire în balon se pipetează 2 ml soluţie sulfat de zinc 80% şi cîteva picături de alcool izobutilic sau etilic(pentru evitarea spumării la agitare).Apoi se introduce soluţie de NaOH 4 N pînă la apariţia de precipitat şi culoare slab-roz.Se lasă în repaus timp de 10 minute agitînd cu intermitenţă.Se completează la semn şi se filtrează sau se centrifughează.In caz de necesitate analiza se poate întrerupe în acest stadiu,păstrînd filtratul în frigider.

Pentru efectuarea reacţiei de culoare se folosesc 8 eprubete sau flacoane conice cu dop rodat după schema următoare.In eprubetele 1-4 se măsoară cîte 5 ml din filtratul obţinut,în eprubetele 5-7-cîte 5 ml soluţie etalon de acid nicotinic şi în eprubeta 8-

5 ml apă distilată. Eprubetele se încălzesc pe baia de apă la 50°C, timp de 5 minute. In eprubetele 1,2,5,6,7 şi 8 se adaugă din biuretă (sub nişă) cîte 2 ml soluţie de brom-tiocian. Eprubetele 3 şi 4 servesc la corecţia pentru substanţele aminoreactive. Conţinutul eprubetelor se agită şi se introduc timp de 10 minute în baia de apă la 50°C. Se răcesc la temperatura camerei şi se lasă la întuneric timp de 10 minute. In eprubetele 3 şi 4 se pun cîte 2 ml apă distilată. In toate eprubetele se adaugă cîte 3 ml soluţie de metol, se agită şi se lasă timp de 60 minute la întuneric.

Conţinutul eprubetelor se filtrează dacă nu este transparent şi se măsoară intensitatea culorii soluţiei la 420 nm (filtru albastru).

<u>Calculul</u> <u>rezultatelor</u> se efectuează după formula :

$$\text{mg acid nicotinic \%} = \frac{(E_1-E_2).0,025.50.50.100}{(E_3-E_4).5.25.p}$$

unde : E_1 - extincţia soluţiei de cercetat (media celor două determinări);

E_2 - extincţia substanţelor aminoreactive în soluţia de cercetat (două determinări);

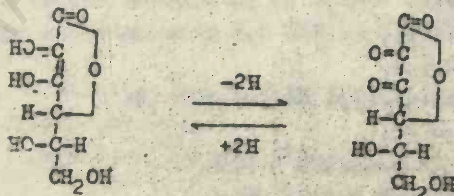
E_3 - extincţia soluţiei etalon de acid nicotinic (media celor trei determinări) ;

E_4 - extincţia probei pentru controlul reactivilor ;

p - greutatea materialului vegetal luat pentru analiză, g.

12.1.5. <u>DOZAREA VITAMINEI C</u>

Vitamina C sau acidul ascorbic face parte din clasa vitaminelor hidrosolubile. Datorită prezenţei în molecula sa a două grupe enolice acidul ascorbic se oxidează uşor şi trece în acidul dehidroascorbic :



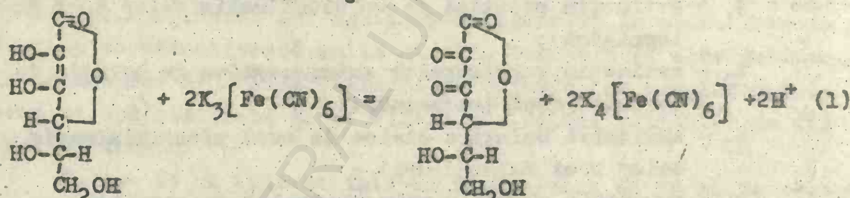
Această reacţie de transformare reversibilă a acidului ascorbic în acid dehidroascorbic stă la baza funcţiilor vitaminei C în diversele procese fiziologice din celula vie.

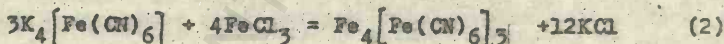
Vitamina C este larg răspîndită în plante,ca roşii,conopidă, spanac,portocale,lămîi,măceş etc.Majoritatea animalelor au posibilitatea să sintetizeze acidul ascorbic şi nu necesită un aport exterior de vitamină C.

Metodele chimice de determinare cantitativă a acidului ascorbic se bazează pe acţiunea lui reducătoare faţă de unii reactivi.

1.2.1.5.1.DOZAREA ACIDULUI ASCORBIC CU AJUTORUL FERICIANURII DE POTASIU

Principiul metodei.In mediu acid vitamina C reduce fericianura de potasiu pînă la ferocianură de potasiu(reacţia 1),care în prezenţa ionilor de fier trivalent formează ferocianura ferică sau albastru de Berlin(reacţia 2) :





$$3K_4[Fe(CN)_6] + 4FeCl_3 = Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KCl \qquad (2)$$

Dacă în mediul de reacţie sînt prezenţi ionii de fluor,atunci albastrul de Berlin nu precipită şi se obţine o soluţie de culoare albastră,a cărei intensitate se poate măsura la fotoelectrocolorimetru.

Reactivi.1.Soluţie tampon cu pH 3,69.Se obţine prin amestecarea unui volum de soluţie de HCl 0,1 N cu un volum egal de soluţie de citrat trisodic 0,1 M.

2.Soluţie de fericianură de potasiu 1%.

3.Soluţie de NaF 2%.

4.Soluţie de acid ascorbic 0,02%.

5.Soluţie de clorură ferică 2% .

Modul de lucru.Se triturează într-un mojar 10-20 g material vegetal(fărîmițat cît mai fin) cu nisip de cuarț sau sticlă pisată și un volum mic de soluție tampon,pînă se obține o pastă uniformă.Amestecul se trece cantitativ într-un balon cotat de 100 ml, spălînd mojarul și pistilul cu soluție tampon și se completează la semn cu această soluție.Conținutul balonului cotat se agită și după 5-10 minute de repaus se filtrează pe filtru cutat sau se centrifughează.Intr-un balon cotat de 100 ml se amestecă 20 ml filtrat(supernatant),1 ml soluție de ferocianură de potasiu și 1 ml soluție de fluorură de sodiu.Volumul soluției din balon se aduce la 80-90 ml cu apă distilată și se adaugă 2 ml soluție de clorură ferică.Se completează cu apă distilată la 100 ml și se agită cu intermitență timp de 5 minute.Apoi se determină extincția soluției de cercetat față de controlul reactivilor la electrofotocolorimetru,utilizînd filtrul roșu.

Pentru a prepara controlul reactivilor într-un balon cotat de 100 ml se pipetează 20 ml soluție tampon,1 ml soluție de fericianură de potasiu,1 ml soluție fluorură de sodiu,2 ml soluție de clorură ferică și se completează volumul la semn cu apă distilată.

Calculul rezultatelor.Conținutul de acid ascorbic se calculează cu ajutorul curbei etalon.Aceasta se trasează folosind o serie de soluții cu concentrațiile de la 2 la 12 micrograme de acid ascorbic într-un ml.In baloane cotate de 100 ml se măsoară cîte 1, 2,3,4,5,6 ml soluție de acid ascorbic 0,02%.In fiecare balon se adaugă toți reactivii introduși în proba pentru controlul reactivilor și se completează cu apă distilată la 100 ml.După 5 minute soluțiile se fotometrează și cu ajutorul datelor obținute se construiește curba etalon.

Calculul cantității de acid ascorbic în materialul vegetal se efectuează conform formulei :

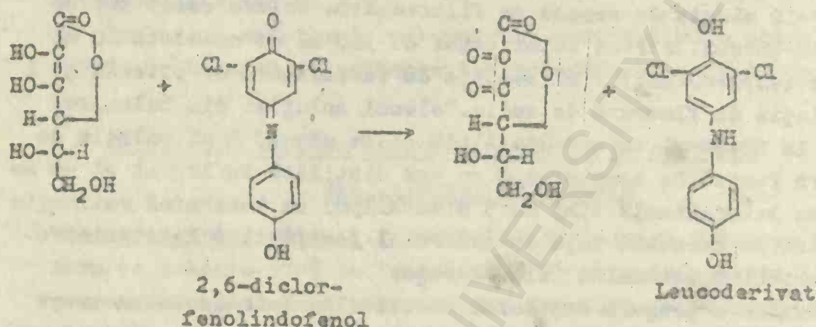
$$\text{mg acid ascorbic \%} = \frac{a.100.100.100}{p.20.1000},$$

unde : a - cantitatea de acid ascorbic găsită pe curba etalon,în micrograme/ml ;

p - greutatea materialului analizat,g.

12.1.5.2. DOZAREA ACIDULUI ASCORBIC PRIN TITRARE CU 2,6-DICLORFENOLINDOFENOL

Principiul metodei. Acidul ascorbic are proprietatea de a reduce 2,6-diclorfenolindofenolul (reactivul Tillmans) în leucoderivatul corespunzător :



DOZAREA ACIDULUI ASCORBIC IN PLANTE

Reactivi. 1. Soluţie de acid oxalic 0,01 N.

2. Soluţie de acid sulfuric 50%.

3. Soluţie de permanganat de potasiu 0,01 N. Se prepară prin diluarea soluţiei de permanganat de potasiu 0,1 N şi se stabileşte factorul soluţiei diluate cu ajutorul soluţiei de acid oxalic. La 10 ml soluţie de acid oxalic exact 0,01 N se adaugă 1,5 ml soluţie de acid sulfuric 50% şi se încălzeşte la 75-80°C. Se titrează cu soluţie de permanganat de potasiu 0,01 N pînă se obţine o culoare slab roz. Factorul soluţiei de permanganat de potasiu (F_p) va fi :

$$F_p = \frac{n_{ao} \cdot F_{ao}}{n_p} = \frac{n_{ao}}{n_p} ,$$

unde : n_{ao} - ml soluţie de acid oxalic ;

F_{ao} - factorul soluţiei de acid oxalic=1

n_p - ml soluţie de permanganat de potasiu.

4. Soluţia de sulfat feroamoniacal $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (sare Mohr) 0,01 N. Se dizolvă 3,92 g de sare Mohr în 1000 ml soluţie de HCl 0,00[illegible] N. Factorul soluţiei de sare Mohr se stabileşte cu soluţia de permanganat de potasiu 0,01 N. Se amestecă 10 ml soluţie de sare Mohr cu 1,5 ml soluţie de acid sulfuric 50%. Se titrează cu soluţie de permanganat de potasiu 0,01 N pînă la apariţia culorii slab roz. Se calculează factorul soluţiei de sare Mohr (F_{SM}) după formula :

$$F_{SM} = \frac{F_p \cdot n_p}{n_{SM}},$$

unde : n_{SM} - ml soluţie de sare Mohr.

5. Soluţie saturată de oxalat de amoniu.

6. Soluţie de 2,6-diclorfenolindofenol 0,001 N. Se dizolvă 0,05 g diclorfenolindofenol în 100-150 ml apă distilată fierbinte într-un balon cotat de 250 ml. Se completează volumul la semn cu apă distilată fiartă şi se filtrează. Se păstrează în sticlă de culoare închisă şi la frigider. Factorul soluţiei de diclorfenolindofenol se determină înainte de fiecare experienţă, folosind în acest scop soluţia de sare Mohr 0,01 N. Intr-un pahar Berzelius se măsoară 10 ml soluţie de diclorfenolindofenol şi 5 ml soluţie saturată de oxalat de amoniu. Amestecul din pahar se titrează (folosind o microbiuretă) cu soluţia de sare Mohr cu normalitate cunoscută, pînă la virarea culorii albastre a diclorfenolindofenolului în galben-oranj. Factorul soluţiei de diclorfenolindofenol (F_{col}) se calculează cu formula :

$$F_{col} = \frac{n_{SM} \cdot F_{SM}}{n_{col}},$$

unde : n_{col} - ml soluţie de diclorfenolindofenol.

7. Soluţie de acid clorhidric 1%.

8. Soluţie de acid oxalic 1%.

<u>Modul</u> <u>de</u> <u>lucru</u>. Materialul vegetal (fructe, frunze, tubercule, etc.) se fărîmiţează în prealabil, cu ajutorul unui cuţit din oţel inoxidabil sau oţel cromat, pe o farfurie de plexiglas (urmele de fier şi mai ales de cupru catalizează descompunerea

acidului ascorbic).[illegible] se realizează cît mai repede posibil.O cantitate de 5-20 g material de cercetat(în dependență de conținutul acidului ascorbic) se introduce într-un mojar şi se adaugă 5-20 ml soluție de HCl 1%(acidul clorhidric împedică oxidarea acidului ascorbic sub acțiunea ascorbatoxidazei prezentă în țesuturile vegetale) şi 5-10 g nisip de cuarț sau sticlă pisată.Se mojarează pînă la obținerea unei mase omogene.Amestecul uniform din mojar se trece cantitativ într-un balon cotat sau un cilindru gradat de 100 ml.Mojarul şi pistilul se spală de 3 ori cu cîte 20 ml soluție de acid oxalic 1%,soluțiile de spălare adunîndu-se în balon sau cilindru.Se completează volumul extractului la 100 ml cu soluție de acid oxalic şi se agită.Conținutul balonului sau cilindrului se filtrează pe filtru uscat într-un pahar uscat.Acidul oxalic ameliorează stabilitatea acidului ascorbic în extract.

Din filtratul obținut se măsoară în două flacoane conice cîte 10-20 ml şi se titrează fiecare probă cu soluție de 2,6-diclorfenolindofenol 0,001 N din microbiuretă,pînă la apariția unei culori slab roz care persistă 30-60 secunde.

<u>Calculul rezultatelor</u>.Se află media valorilor obținute la titrarea celor două probe.Conținutul de acid ascorbic,exprimat în mg,la 100 g de țesut vegetal se calculează după formula :

$$\text{mg acid ascorbic \%} = \frac{n.F.0,088.100.100}{p.v} ,$$

unde : n - volumul(ml) soluției de 2,6-diclorfenolindofenol consumat la titrare ;

F - factorul soluției de 2,6-diclorfenolindofenol ;

0,088 - mg de acid ascorbic corespunzătoare la 1 ml soluție de 2,6-diclorfenolindofenol exact 0,001 N ;

p - greutatea materialului analizat,în g ;

v - volumul(ml) de filtrat luat pentru titrare.

12.1.5.3. DOZAREA VITAMINEI C PRIN METODA IODOMETRICA

Principiul metodei. In mediu acid iodatul de potasiu reacţionează cu iodura de potasiu punînd în libertate iodul :



$$KIO_3 + 5KI + 6HCl \longrightarrow 3I_2 + 6KCl + 3H_2O$$

Iodul eliberat conform acestei reacţii oxidează acidul ascorbic la acid dehidroascorbic :



$$\text{acid ascorbic} + I_2 \longrightarrow \text{acid dehidroascorbic} + 2HI$$

Ca indicator se foloseşte soluţia de amidon care se colorează în albastru imediat ce acidul ascorbic a fost oxidat complet.

DOZAREA VITAMINEI C IN PLASMA SANGUINA

Reactivi. 1. Soluţie de acid tricloracetic 10%.

2. Soluţie de iodură de potasiu 2%.

3. Soluţie de amidon 1%.

4. Soluţie de iodat de potasiu 0,001 N. Se prepară din soluţia de iodat de potasiu 0,1 N.

5. Soluţie de oxalat de sodiu 1,34%.

Modul de lucru. Intr-o eprubetă de centrifugă se amestecă cu o baghetă de sticlă 0,3 ml soluţie de oxalat de sodiu 1,34% şi 4,5 ml sînge venos. Prin centrifugare timp de 15 minute la 3000 rot./min. se separă plasma. Intr-o altă eprubetă de centrifugă se măsoară 2 ml plasmă şi un volum egal de soluţie de acid tricloracetic 10%. Se agită conţinutul prin scuturarea eprubetei şi se centrifughează.

Intr-un flacon conic de 25 ml se pipetează 2 ml supernatant, 2,5 ml apă distilată, 0,5 ml soluţie de iodură de potasiu 2% şi 1-2 picături de amidon 1%. Se titrează imediat cu soluţie de iodat de potasiu 0,001 N pînă la apariţia unei coloraţii albastre deschis.

Paralel se efectuează o probă de control: într-un flacon conic se toarnă 1 ml soluţie de acid tricloracetic 10%, 3,5 ml apă distilată, 0,5 ml soluţie de iodură de potasiu, 1-2 picături de amidon şi se titrează în acelaşi mod ca şi proba de cercetat.
La titrarea controlului soluţia de iodat de potasiu se adaugă în

flacon cîte 0,01 ml dintr-o microbiuretă sau o pipetă de 1 ml.

Calculul rezultatelor. Un ml soluţie de iodat de potasiu exact 0,001 N corespunde la 0,088 mg acid ascorbic.

Din numărul de ml soluţie de iodat de potasiu consumaţi la titrarea probei cu sînge(n_s) se scade numărul de ml soluţie mergi la titrarea controlului(n_c). De obicei pentru control se folosesc 0,01-0,02 ml soluţie de iodat.

Concentraţia vitaminei C, în mg, la 100 ml sînge, se calculează conform formulei :

$$\text{mg vitamină C \%} = (n_s - n_c) . 0,088 . \frac{4}{2} . \frac{4,8}{2} . \frac{100}{4,5}$$

DOZAREA VITAMINEI C IN URINA

Reactivi. 1. Soluţie de HCl 5%.

2. Reactivii 2-4 de la "Dozarea vitaminei C în plasma sanguină".

Modul de lucru. La 10 ml apă distilată se adaugă 2 ml urină filtrată, 1 ml soluţie de HCl 5%, 1 ml iodură de potasiu 2% şi 10 picături de amidon 1%. Amestecul se titrează cu soluţie de iodat de potasiu 0,001 N pînă la apariţia coloraţiei albastre, persistentă cel puţin 30 de secunde.

Paralel se realizează o probă de control cu 12 ml apă distilată. In proba de control colorarea lichidului trebuie să se producă la adăugarea a 2-3 picături de soluţie de iodat de potasiu. Dacă soluţia nu devine albastră după 5 picături de reactiv, înseamnă că undeva s-a strecurat o greşală, de exemplu, la prepararea soluţiei de amidon. Această soluţie trebuie să fie proaspătă.

Calculul rezultatelor. S-a stabilit că 1 ml soluţie de iodat de potasiu 0,001 N este echivalent cu 0,088 mg de acid ascorbic. Conţinutul de vitamină C, în mg, în 100 ml urină se află după formula :

$$x = (n_p - n_c) . 0,088 . \frac{100}{2} ,$$

unde : n_p - ml soluţie de iodat de potasiu 0,001 N folosiţi la titrarea probei cu urină ;

n_c - ml soluţie de iodat de potasiu 0,001 N folosiţi la titrarea probei de control.

12.2.DETERMINAREA HORMONILOR

12.2.1.DOZAREA 17-CETOSTEROIZILOR IN URINA PRIN METODA CU META-DINITROBENZEN

Pentru estimarea stării funcţionale a corticosuprarenalelor adesea se apelează la determinarea cantităţii totale de 17-cetosteroizi neutri în urină.Toţi aceşti compuşi au o trăsătură structurală comună-prezenţa grupării cetonice la atomul de carbon 17 din nucleul steranic.In fracţia 17-cetosteroizilor intră combinaţii diferite după provenienţa lor(din corticosuprarenale, glandele sexuale) şi cu activitate biologică variată.Majoritatea 17-cetosteroizilor din urină,ca androsterona şi etiocolanolona, sînt produşi ai metabolismului hormonilor steroidici sintetizaţi de corticosuprarenale şi testicule.De aceea dozarea 17-cetosteroizilor totali din urină este puţin specifică.Totuşi această determinare poate servi ca un test accesibil în cazul investigării corticosuprarenalelor afectate de tumori canceroase,precum şi pentru diagnosticarea bolii lui Addison şi altor maladii.

Principiul metodei.Esterii hormonilor cetosteroidici prezenţi în urină sînt hidrolizaţi în mediu acid la cald.Apoi 17-cetosteroizii liberi şi cei eliberaţi pe calea hidrolizei sînt extraşi din materialul de analizat cu eter etilic.Extractul eteric se purifică şi se evaporă la sec,în reziduul obţinut dozîndu-se 17-cetosteroizii pe baza reacţiei lor de culoare cu meta-dinitrobenzenul în mediu alcalin.

Reactivi.1.Eter etilic(fără peroxizi).
2.Etanol absolut(purificat de aldehide şi cetone).
3.Acid clorhidric concentrat.
4.Acid acetic glacial.
5.Soluţie de hidroxid de sodiu 10%.
6.Soluţie de KOH 5 N în metanol.Se dizolvă 28 g KOH în 70 ml metanol,se completează la 100 ml cu metanol şi se filtrează.După

filtrare soluţia de KOH se titrează cu soluţie de HCl 0,1 N în prezenţa metiloranjului ca indicator.

7. Soluţie de meta-dinitrobenzen recristalizat 2% în etanol.

8. Metanol, dublu distilat.

9. Cloroform p.a.

10. Soluţie de formaldehidă 40%. Soluţia se diluează în raportul 1:5 cu apă distilată.

11. Soluţie standard de dehidroepiandrosteronă sau androsteronă 100 micrograme/ml. Se dizolvă 5 mg cetosteroidă în 50 ml etanol absolut.

Modul de lucru. Hidroliza 17-cetosteroizilor legaţi. Intr-un flacon conic de 100 ml se amestecă 20 ml urină (luată din urina pe 24 ore), 3 ml acid clorhidric concentrat, 1 ml acid acetic glacial şi 0,2 ml soluţie diluată de formaldehidă. In gîtul flaconului se introduce o pîlnie şi se aşază pe baia de apă la fierbere pentru 15 minute. Apoi flaconul se răceşte sub un jet de apă de la robinet.

Extracţia 17-cetosteroizilor şi purificarea extractului. Conţinutul flaconului se transvazează într-o pîlnie de separare de 100 ml. Se adaugă în pîlnia de separare 10 ml eter etilic cu care s-a spălat în prealabil flaconul folosit la hidroliză. Se agită conţinutul pîlniei timp de 60-90 secunde. Stratul inferior de urină se îndepărtează. Extracţia cu eter se repetă încă odată.

Extractele eterice unite se spală de trei ori cu cîte 10 ml soluţie de NaOH 10% (fiecare spălare cu soluţie de hidroxid trebuie să dureze 3 minute). Faza alcalină, conţinînd estrogenii şi substanţe acide, se elimină, iar extractul se spală cu 10 ml apă distilată. După ce apa se separă cu atenţie, extractul eteric se trece în porţiuni într-o eprubetă de centrifugă şi se evaporă la cald pe baia de apă (temperatura apei din baie nu trebuie să depăşească 50^{0}C). Extractele uscate obţinute în această etapă pot să se păstreze la frigider pînă a doua zi.

Reacţia de culoare. La reziduul uscat din eprubeta de centrifugă se adaugă 0,2 ml etanol absolut, 0,2 ml soluţie de KOH în metanol şi 0,2 ml soluţie alcoolică de meta-dinitrobenzen. Amestecul se agită şi eprubeta se plasează la întuneric pentru dezvoltarea culorii, timp de 60 minute, la temperatura camerei.

Paralel se efectuează o probă de control pentru reactivi. Intr-o eprubetă se pipetează 0,2 ml etanol absolut,0,2 ml soluţie de KOH în metanol şi 0,2 ml soluţie alcoolică de meta-dinitrobenzen.Conţinutul se amestecă şi se tratează mai departe în mod identic cu proba de cercetat.

La terminarea perioadei de 60 minute,în fiecare eprubetă se pun cîte 3 ml soluţie etanol 50% şi 2 ml cloroform ;amestecul se agită energic prin scuturarea eprubetelor.Produşii de reacţie coloraţi în violet trec în stratul inferior,cloroformic,iar culoarea nespecifică(galben-maro sau maro) rămîne în stratul alcoolic superior.După 1-2 minute stratul superior se îndepărtează cu ajutorul unei pipete Pasteur.Această operaţie trebuie făcută cu grijă,pentru a evita absorbţia stratului cloroformic în capilara pipetei.

In eprubeta cu stratul cloroformic se introduce 1 ml etanol absolut.Se agită şi se citeşte extincţia probei cu urină,faţă de proba de control,la 520 nm(filtru verde),închizînd cuvele cu capacul.

Culoarea amestecului de reacţie este stabilă timp de 60 minute.In legătură cu aceasta,fiecare serie de determinări nu trebuie să cuprindă mai mult de 10-15 probe.

Calculul rezultatelor. se poate face cu ajutorul formulei sau după curba de etalonare.

In primul caz,paralel cu probele de cercetat,se evaporă la sec 0,5 ml soluţie standard,conţinînd 50 micrograme androsteronă sau dehidroepiandrosteronă.Reziduul uscat se supune mai departe aceloraşi operaţii ca şi probele de cercetat şi controlul.

Cantitatea 17-cetosteroizilor neutri,în mg,în urina din 24 ore se poate calcula cu formula :

$$X = \frac{E_{cer} \cdot V \cdot 50}{E_{st} \cdot 20 \cdot 1000} ,$$

unde : E_{cer} - extincţia probei de cercetat(probei cu urină) ;
E_{st} - extincţia probei standard ;
V - volumul(ml) urinii din 24 ore ;

50 - micrograme androsteronă sau dehidroepiandrosteronă în probă standard ;

1000 - coeficient de conversie a microgramelor în miligrame.

Pentru calcularea cantităţii de 17-cetosteroizi după curba etalon se foloseşte formula :

$$X = \frac{a.V}{20.1000}$$

unde : a - cantitatea 17-cetosteroizilor în proba de urină analizată, în micrograme, citită pe curba de etalonare.

Schema de trasare a curbei etalon presupune evaporarea la sec a unei serii de volume crescînde de la 0,1 la 1 ml de soluţie standard(care corespund la 10...100 micrograme). Cu reziduul probelor standard se efectuează reacţia de culoare în modul descris pentru proba de urină.

<u>Valori normale</u>. In condiţii normale cantitatea 17-cetosteroizilor în urina din 24 ore variază la bărbaţi între 6,6 şi 23,4 mg/24 ore, iar la femei între 6,4 şi 18,02 mg/24 ore.

<u>Variaţii fiziopatologice</u>. Nivelul excreţiei 17-cetosteroizilor în urină variază cu vîrsta pacienţilor, fiind sub valorile normale la copii.

In boala lui Addison excreţia 17-cetosteroizilor este pronunţat diminuată. Cantitatea 17-cetosteroizilor scade în hipotireoză, ciroză etc.

Cancerul corticosuprarenalelor se caracterizează prin creşterea conţinutului 17-cetosteroizilor în urină.

<u>Bibliografie</u> : 20,25,33,35,36,41

BIBLIOGRAFIE

1.Artenie V. : Lucrări practice de chimie biologică, Centrul de Multiplicare al Universităţii "Al.I.Cuza" Iaşi, 1970
2.Artenie V. : Curs de chimie biologică. Vol.I, Centrul de Multiplicare al Universităţii "Al.I.Cuza" Iaşi, 1971
3.Artenie V. : Curs de chimie biologică. Vol.II, Centrul de Multiplicare al Universităţii "Al.I.Cuza" Iaşi, 1976
4.Bailey J.L. : Techniques in protein chemistry. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1962
5.Bănăţeanu I., Călugaru A., Slabu Z. : Metode fizico-chimice de analiză, Ed.tehnică, Bucureşti, 1961
6.Devaux G. et al. : Choix de techniques de biochimie clinique. Gauthier-Villars Editeur, Paris, 1970
7.Dévényi T. and Gergely J. : Amino Acids, Peptides and Proteins. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1974
8.Deyl Z., Macek K., Janak J.(Editors) : Liquid column chromatography. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York, 1975
9.Duca A., Nacu A., Calu Cleopatra : Chimie analitică şi analiza instrumentală, Vol III. Institutul Politehnic Iaşi, 1980
10.Dumitru I.F., Iordăchescu Dana : Enzime. Editura Medicală, Bucureşti, 1974
11.Dumitru I.F. : Lucrări practice de biochimie. EDP, Bucureşti, 1967
12.Ewing G.W. : Instrumental Methods of Chemical Analysis, New York, 1954
13.Gavrilenko V.F., Ladîghina M.E., Handobina L.M. : Bolişoi praktikum po fiziologhii rastenii. "Vîsşhaja shkola", Moskva, 1975
14.Georgescu P., Păunescu E. : Metode biochimice de diagnostic şi cercetare. Editura Medicală, Bucureşti, 1960
15.Gräser H. : Biochemisches Practikum. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1977
16.Herout V., Keil B., Hudlicky M., Ernest I., Gut J. : Tehnica lucrărilor de laborator în chimia organică. Traducere din

limba cehă.Editura Tehnică,Bucureşti,1959
17.Idu S.M.,Cîmpeanu S. :Electroforeza.Tehnică şi clinică.Editura medicală,Bucureşti,1957
18.Ivanov I.I.,Korovkin B.F.,Markelov I.M.:Vvedenie v Kliniceskuiu enzimologhiu.Izd-vo "Meditsina",Moskva,1974
19.Kocetov G.A. :Prakticeskoe rukovodstvo po enzimologhii.Izd-vo "Vîsghaja shkola,Moskva,1971
20.Kolb V.G.,Kamîsnikov V,S. :Kliniceskaja biohimija.Izd-vo "Belarusi",Minsk,1976
21.Kon..rev B.G.,Tiuterev S.L. :Metodî biohimii i ţitohimii nukleinovîh kislot rastenii."Kolos",Leningrad,1970
22.Ladislau K. :Analiză fizico-chimică.EDP,Bucureşti,1969
23.Larskii E.G. :Metodî zonalinogo electroforeza.Izd-vo"Meditsina",Moskva,1971
24.Lealikov I.S. :Metode fizico-chimice de analiză.Traducere din limba rusă,EDP,Bucureşti,1963
25.Lebedeva P.T.,Usovici A.T. :Metodî issledovanija kormov,organov i tkanei jivotnîh."Rosselihozizdat",Moskva,1969
26.Luca C. :pH-ul şi aplicaţiile lui.Ediţia a doua îmbunătăţită. Editura tehnică,Bucureşti,1973
27. Lucrări practice de chimie fizică.Traducere din limba polonă,Editura tehnică,Bucureşti,1958
28.Mais I.M.,Macek K. :Cromatografia pe hîrtie.Traducere din limba cehă.Editura Tehnică,Bucureşti,1965
29.Manta I. şi colab. :Metode biochimice în laboratorul clinic. Editura Dacia,Cluj-Napoca,1976
30.Métais P.,Bieth J. :Détermination de l'alfa-amylase par une microtechnique."Ann.biol.clin.",1968,Tom 26,nr.1-2,133-142
31. Metode moderne de analiză.Partea II-a.Metode cromatografice de analiză.Centrul de Documentare al Industriei Petrolului şi Chimiei,1965
32. Metodî biohimiceskogo issledovanija rastenii.Izd.2-e. "Kolos",Leningrad,1972
33. Metodî biohimiceskogo analiza rastenii.Izd-vo Leningradskogo Universiteta,Leningrad,1978

34 Metodî fiziologo-biohimiceskogo issledovanija vodoroslei v ghidrobiologhiceskoi praktike."Naukova Dumka",Kiev,1973
35.Nesterova E.A. : Metodî opredelenija vitaminov v kormah."Kolos", Moskva,1967
36. Novîe metodî i modificaţii biohimiceskih issledovanii v jivotnovodstve."Kolos",Moskva,1970
37.Muţă Gh., Bugneag C. : Investigaţii biochimice.EDP,Bucureşti, 1977
38.Peşkova V.M.,Gromova M.I. : Prakticeskoe rukovodstvo po spectrofotometrii i kolorimetrii.Izd-vo Moskovskogo Universiteta,1961
39.Petrov K.P. : Practicum po biohimii pishchevogo rastitelinogo sîrija.Izd-vo "Pishchevaja promîshlennosti",Moskva,1965
40.Pogany I.,Panciu M. : Metode fizice în analiza organică.Editura ştiinţifică,Bucureşti,1972
41.Pleşkov B.P. : Praktikum po biohimii rastenii."Kolos",Moskva, 1976
42.Prohorova M.I.,Tupikova Z.N. : Bolishoi praktikum po uglevodnomu i lipidnomu obmenu.Izd-vo Leningradskogo Universiteta, 1965
43. Sovremennîe metodî v biohimii."Meditsina",Moskva,1977
44.Sharpenak A.E.,Komîshev V.A. : Praktikum po biologhiceskoi himii."Vîsghaja shkola",Moskva,1969
45.Tănase Ioana : Tehnica cromatografică.Aminoacizi,proteine,acizi nucleici.Editura tehnică,Bucureşti,1967
46.Tănăsescu Gh.,Costescu Georgeta : Lucrări practice de biochimie medicală.EDP,Bucureşti,1966
47. Tehnika biohimiceskogo issledovanija subkletocinîh struktur i biopolimerov.Izd-vo "Nauka i Tehnika",Minsk,1977
48.Tîperovici A.S. : Fermentî.Izd-vo "Tenika",Kiev,1971
49.Veremeenko K.N. : Fermentî proteoliza i ih inghibitorî v mediţinskoi praktike."Zdorov'ja",Kiev,1971
50.Williams.B.L. and Wilson K.(Editors) : Principles and Techniques of Practical Biochemistry,Edward Arnold,London,1975


1986